

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**THERAPIESTUDIE ZUR WIRKUNG EINES
VASOPRESSIN-REZEPTOR-AGONISTEN UND ZWEIER
ANTAGONISTEN AN EINEM MAUSMODELL DER
POLYZYSTISCHEN NIERENERKRANKUNG**

von Helen Reinfrank
aus Landau in der Pfalz
München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Angefertigt am: Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie
der Universität Regensburg

Mentor: Prof. Dr. med. Ralph Witzgall

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke
Korreferent/ en:	Priv.-Doz. Dr. Petra Kölle

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Hakuna Matata

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. DIE NIERE	2
1.1. Anatomie und Histologie.....	2
1.2. Funktion und Physiologie	5
2. POLYZYSTISCHE NIERENERKRANKUNG.....	5
2.1. Autosomal-rezessive Form der humanen PKD	6
2.2. Autosomal-dominante Form der humanen PKD	6
2.3. Polyzystische Nierenerkrankung im Tierreich	8
2.4. Pathogenese der Zystenentstehung	8
3. THERAPIEANSATZ VASOPRESSIN-REZEPTOR	9
3.1. Vasopressin und sein Rezeptor.....	9
3.2. Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten.....	12
4. ZIELSETZUNG	13
III. MATERIAL UND METHODEN.....	15
1. VERWENDETES MAUSMODELL UND HALTUNGSBEDINGUNGEN DER TIERE	15
2. MEDIKATION	15
2.1. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264.....	15
2.2. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260.....	16
2.3. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1	17
3. VERSUCHSAUFBAU: THERAPIESTUDIE UND VERSUCH ZUR DOSISFINDUNG	17
4. URINUNTERSUCHUNG.....	19
4.1. Bestimmung des Volumens.....	19
4.2. Messung der Osmolalität.....	19
4.3. Analyse der Harnstoffkonzentration	20
4.4. Analyse der Kreatininkonzentration.....	20
4.5. Analyse der Proteinkonzentration.....	21
4.6. Analyse der Elektrolytkonzentration	21
5. BLUTENTNAHME UND PLASMA-ANALYSE.....	22
5.1. Blutentnahme am wachen Tier.....	22
5.2. Blutentnahme unter Allgemeinanästhesie	22
5.3. Analyse der Harnstoff- und Kreatininkonzentration.....	22
6. ORGANAUFARBEITUNG	23
6.1. Perfusionsfixierung und Organentnahme.....	23
6.2. Einbettung der Nieren in Paraffin	23
7. HISTOLOGIE DER PRÄPARATE	23
7.1. Herstellung der histologischen Paraffinschnitte	23
7.2. Färbung der histologischen Schnitte	24

7.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Darstellung der Morphologie	24
7.2.2. Sirius-Rot-Färbung zur Darstellung fibrotischer Strukturen.....	25
7.3. Auswertung der histologischen Präparate.....	25
7.3.1. Morphometrische Analyse der zystischen Veränderungen im Nierenparenchym	25
7.3.2. Morphometrische Analyse der fibrotischen Veränderungen im Nierenparenchym	26
8. STATISTISCHE AUSWERTUNG	26
IV. ERGEBNISSE	27
1. ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE ZUR FINDUNG DER APPLIKATIONSART UND DOSIS	27
1.1. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 zeigte <i>in vivo</i> keinen antidiuretischen Effekt	28
1.2. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 bewirkte in der CD1 ^{pcy/pcy} Maus keine Diurese.....	29
1.3. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 zeigte sowohl in einem Mausmodell der PKD als auch in einem Wildtyp-Modell einen diuretischen Effekt	30
1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche	34
2. ERGEBNISSE IM VERLAUF DER THERAPIESTUDIE.....	35
2.1. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Abweichungen des Körpergewichts und der beschriebenen Urinparameter	36
2.2. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 bewirkte keine Diurese und erhöhte alle beschriebenen Urinparameter gegenüber der Kontrollgruppe	42
2.3. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 zeigte über den gesamten Studienzeitraum einen diuretischen Effekt in Korrelation mit einer Reduktion aller gemessenen Parameter im Urin.....	47
3. ERGEBNISSE AM ENDE DER THERAPIESTUDIE.....	52
3.1. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 führte zu einer deutlichen Zunahme des Nierengewichts im Tiermodell.....	53
3.2. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 bewirkte im Tiermodell eine Reduktion der zystischen und fibrotischen Veränderungen des Nierenparenchyms	58
3.3. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 hemmte die zystische Degeneration des Nierenparenchyms im Tiermodell	63
4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER THERAPIESTUDIE	68
V. DISKUSSION	71
VI. ZUSAMMENFASSUNG	81
VII. SUMMARY	83
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	84
IX. ANHANG	91
X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	96
XI. TABELLENVERZEICHNIS	100
XII. DANKSAGUNG.....	101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

0,9 % NaCl	0,9 % Natriumchlorid, isotone Kochsalzlösung
4 % PFA in 1x PBS	4 % Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADPKD	Autosomal-dominant polycystic kidney disease
ARPKD	Autosomal-recessive polycystic kidney disease
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EHSPT	N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidin
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
ip.	intraperitoneal
kDa	kilodalton
mTOR	mammalian target of rapamycin
MW	Mittelwert
NADH/NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
PKD	polycystic kidney disease
rpm	revolutions per minute
sc.	subkutan
SD	Standardabweichung
vs.	versus

I. EINLEITUNG

Die Redensart „das geht mir an die Nieren“ wird verwendet, um Unwohlsein und starke Betroffenheit in Worte zu fassen. Diese Ausdrucksweise macht deutlich, dass die Nieren zum einen in der Bauchhöhle nicht so leicht zugänglich sind – das ungute Gefühl geht sehr tief hinein - und zum anderen einen sehr hohen Stellenwert für den Menschen haben: Ohne die Niere ist der Mensch nicht lebensfähig. Umso schlimmer ist es, wenn die Niere nicht mehr in der Lage ist ihre Funktionen im Körper adäquat zu erfüllen. Ein Grund für einen Funktionsverlust ist eine zystische Degeneration der Niere, die in Form der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) als eine der häufigsten hereditären Erkrankungen auftritt. Die bisher nutzbaren Therapiemöglichkeiten für betroffene Patienten beschränken sich auf die extrakorporale Reinigung des Blutes und auf den Ersatz der Nieren durch eine Organtransplantation. Dieser invasive Eingriff ist für die Patienten und ihre Angehörigen oftmals mit einem Verlust von Lebensqualität und einem langen Leidensweg verbunden. Essentiell ist die Entwicklung einer spezifischen Therapie, die die Progression der polyzystischen Nierenerkrankung möglichst früh verlangsamt und idealerweise zu ihrer Regression führt.

Circa 20 Jahre nach der Entdeckung der betroffenen Gene und ihrer Produkte Polycystin-1 und Polycystin-2 sind die molekularen Mechanismen, die bei der ADPKD zur Entstehung und zum Wachstum der Zysten führen, noch nicht gänzlich verstanden. Die aus aktuellen Forschungsarbeiten gewonnenen Erkenntnisse eröffnen jedoch eine Reihe von möglichen Angriffspunkten für therapeutische Maßnahmen. Es gibt sehr viele Hinweise, dass der intrazelluläre Botenstoff cAMP eine zentrale Rolle in der Zystenbildung spielt. Physiologischerweise wird der intrazelluläre cAMP-Spiegel in der Niere von Vasopressin über den Vasopressin-Rezeptor V2 reguliert. Der V2-Rezeptor bietet einen sehr vielversprechenden Angriffspunkt für eine therapeutische Intervention. Diese Studie beschäftigt sich mit den Auswirkungen einer Stimulation und Inhibition dieses Rezeptors in einem Mausmodell der polyzystischen Nierenerkrankung. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass auf diesem Weg die Ausprägung der zystischen Degeneration des Nierenparenchyms moduliert werden kann.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Niere

1.1. Anatomie und Histologie

Zum Harnapparat zählen folgende Organe:

- Die paarig angelegte Niere (*Ren*),
- das Nierenbecken (*Pelvis renalis*),
- der Harnleiter (*Ureter*),
- die Harnblase (*Vesica urinaria*),
- und die Harnröhre (*Urethra*).

Die Niere des Menschen hat eine Größe von circa 11x 4x 7 cm und ein Gewicht von 100 bis 200 g. Sie ist von mehreren Schichten umgeben, die für die Erhaltung ihrer Lage im Retroperitonealraum verantwortlich sind. Direkt auf der Nierenoberfläche findet sich eine dünne locker mit dem Nierenparenchym verbundene Organhülle aus straffem Bindegewebe (*Capsula fibrosa*). Zusammen mit der Nebenniere ist die Niere in eine fettreiche Organkapsel (*Capsula adiposa*) eingebettet. Nach außen folgt ein bindegewebiger Faszien sack (*Fascia renalis*) durch den die versorgenden Blutgefäße und der Harnleiter führen.

Das Nierenparenchym (Abbildung 1) ist unterteilt in die schmale subkapsulär liegende Nierenrinde (*Cortex renalis*) und das sich nach innen anschließende Nierenmark (*Medulla renalis*). Dieses ist in 8 bis 18 Nierenpyramiden (*Pyramides renales*) gegliedert. Zwischen den Pyramiden zieht die Nierenrinde als Säulen (*Columnae renales*) in die Tiefe. Zusammen bilden die Markpyramiden und die Rindensäulen die Nierenlappen (*Lobuli renales*). Mit ihrer Spitze (*Papilla renalis*) münden die Pyramiden in die Nierenkelche (*Calices renales*), die den auszuscheidenden Harn aufnehmen und in das Nierenbecken (*Pelvis renalis*) leiten. Dieses liegt zusammen mit den versorgenden Blutgefäßen (*Arteria* und *Vena renalis*) den Lymphgefäßen und den Nervenfasern in einem Hohlraum im Inneren der Niere, dem *Sinus renalis*.

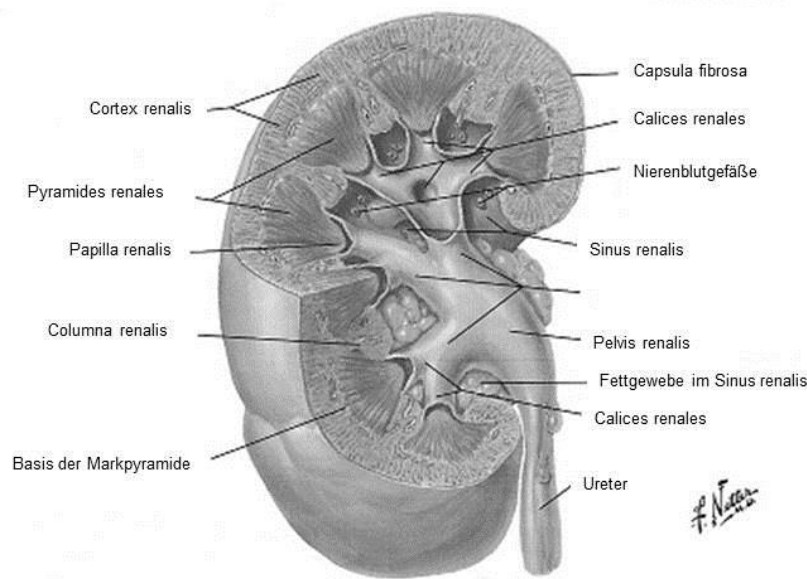


ABBILDUNG 1: Darstellung des Nierenparenchyms und des *Sinus renalis*. Menschliche rechte Niere in mehreren Schnittebenen (modifiziert nach Frank Netter).

Das Nephron stellt die Funktionseinheit der Niere dar und ist für die Filtration des Blutes und die Produktion von Harn verantwortlich. Auf diesem Weg werden die harnpflichtigen Substanzen Harnstoff, Harnsäure und Ammoniak sowie andere unerwünschte Stoffe aus dem Körper geleitet. Es besteht aus folgenden Anteilen:

- Dem in der Nierenrinde lokalisierten Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*)
- und dem harnableitenden System (*Tubulus renalis*).

Das Nierenkörperchen setzt sich aus einem stark verzweigten Netz aus Blutkapillarschlingen (*Glomerulum*) und dessen Umhüllung, der *Bowman-Kapsel*, zusammen. Zwischen den einzelnen Kapillarschlingen befindet sich das *Mesangium*. Dieses aus Zellen und extrazellulärer Matrix bestehende Stützgerüst dient der mechanischen Stabilisierung der Kapillarschlingen. Durch seine Fähigkeit zur Phagozytose und zur Produktion von Zytokinen trägt es zur Immunabwehr der Niere bei. Am Gefäßpol des Nierenkörperchens gelangt das Blut über die afferente Arteriole in das Glomerulum und verlässt dieses dort wieder über die efferente Arteriole. Auf seinem Weg wird es durch drei Schichten, die fenestrierte Kapillarendothel, die glomeruläre Basalmembran und die Podozyten-Schicht, gefiltert. Die Podozyten sind durch ihre weit reichenden Fortsätze eng miteinander verzahnt und die glomeruläre Basalmembran trennt sie von den Endothelzellen und dem umgebenden Mesangium.

Aus der Ultrafiltration des Blutes durch den glomerulären Filter resultiert der Primärharn (circa 170 Liter/24 h). Er ist nahezu frei von hochmolekularen Proteinen sowie von korpuskulären Bestandteilen des Bluts. Er wird am Harnpol des Nierenkörperchens in den Nierentubulus geleitet.

Der Nierentubulus besteht aus den folgenden im Detail beschriebenen Abschnitten:

- **Proximaler Tubulus**
Der proximale Tubulus beginnt am Harnpol des Nierenkörperchens. Er unterteilt sich in einen stark gewundenen Abschnitt (*Pars convoluta*), der nahe beim Nierenkörperchen liegt und in einen gerade verlaufenden Abschnitt (*Pars recta*), der in das Nierenmark zieht und den ersten Abschnitt der Henle-Schleife bildet. Das Tubulusepithel besteht aus mitochondrienreichen kubischen Zellen, die zur Vergrößerung ihrer Oberfläche luminal einen ausgeprägten Bürstensaum tragen. Die Aufgabe des proximalen Tubulus ist vor allem die Resorption von Wasser und nicht harnpflichtiger Substanzen.
- **Intermediärer Tubulus**
Als Teil der Henle-Schleife steigt der intermediäre Tubulus zunächst weiter in das Nierenmark (*Pars descendens*) ab und kehrt dann zurück in die Nierenrinde (*Pars ascendens*). Er zeichnet sich durch ein flaches einschichtiges Epithel aus und dient vor allem der Resorption von Wasser.
- **Distaler Tubulus**
Der distale Tubulus ist zunächst gerade und verläuft als Teil der Henle-Schleife zurück zum dazugehörigen Nierenkörperchen (*Pars recta*). Kurz danach geht er in einen gewundenen Anteil über (*Pars convoluta*). An der Stelle, an der der distale Tubulus in direkten Kontakt mit dem Nierenkörperchen tritt, ist die *Macula densa* ausgebildet. Hier sind die kleinen kubischen Epithelzellen schmaler und höher als im Rest des distalen Tubulus. Zusammen mit den Zellen des extraglomerulären Mesangiums und den glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole bilden sie den juxtaglomerulären Apparat. Dieser dient der Überwachung der Natriumkonzentration im Blut und unterstützt die Regulation des Blutdrucks.

Im Tubulussystem entsteht aus dem Primärharn durch stetiges Konzentrieren der Sekundärharn (1 bis 2 Liter/24 h). Wasser und für den Körper wertvolle Substanzen wie Glukose und Aminosäuren werden resorbiert und für den Körper schädliche Substanzen werden zusätzlich sezerniert. Vom distalen Tubulus gelangt der Harn über Verbindungstubuli in das Sammelrohr (*Ductus colligens*). Hier wird das Endvolumen des Sekundärharns über Resorption von Wasser bestimmt. Über die Nierenpapillen läuft der Endharn in das Nierenbecken und wird von dort vom Harnleiter zur Harnblase transportiert, wo er gesammelt und kontrolliert ausgeschieden wird.

Die Blutversorgung der Niere erfolgt über die *Arteria renalis* (aus der *Aorta abdominalis* entspringend) und über die *Vena renalis* (in die *Vena cava inferior* einmündend). Circa 20 % des Herzminutenvolumens (1 Liter/min) dienen der Durchblutung der Niere wobei 90 % des renalen Blutstroms durch die Nierenrinde fließen und nur ungefähr 10 % zur Durchblutung des Nierenmarks bleiben.

Zur Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsrate, also des Flüssigkeitsvolumens, das pro Zeiteinheit gefiltert wird, sind ein gleichbleibender renaler Blutfluss und Blutdruck nötig. Mit Hilfe von Barosensoren in der afferenten und efferenten Arteriole ist die Niere in der Lage, Änderungen des renalen Blutdrucks wahrzunehmen und ihn über Variierung des Gefäßlumens durch Vasokonstriktion und Vasodilatation unabhängig von dem systemischen Blutdruck an ihre Bedürfnisse anzupassen.

1.2. Funktion und Physiologie

Die Niere erfüllt diverse Aufgaben, die für den Körper von großer Bedeutung sind:

- Als Ausscheidungsorgan leitet sie über den Harn Stoffwechselendprodukte, anorganische Stoffe sowie überflüssige und schädliche Substanzen aus dem Körper. Tubuläre Resorption und Sekretion ermöglichen deren qualitative und quantitative Ausscheidung. Wichtige Stoffe wie Glukose und Aminosäuren dagegen werden vom glomerulären Filter zurückgehalten.
- Über die kontrollierte Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten sorgt die Niere für eine gleichbleibende Osmolarität der Körperflüssigkeiten und ist sie so an der Regulation des systemischen Blutdrucks beteiligt.
- Über das Hormon Erythropoetin aktiviert und kontrolliert die Niere die Bildung von neuen Erythrozyten aus Stammzellen im Knochenmark.
- Zusätzlich ist die Niere wesentlich am Knochenstoffwechsel beteiligt, indem sie aus Vorstufen aus der Nahrung Kalzitriol, die aktive Form des Vitamin D, herstellt und die Ausscheidung von Kalzium und Phosphat beeinflusst.

Die Aufgaben der Niere sind für den gesamten Körper von großer Wichtigkeit. Eine Einschränkung oder gar ein Verlust der Nierenfunktion führt sehr schnell zu einem lebensbedrohlichen Zustand.

2. Polyzystische Nierenerkrankung

Die polyzystische Nierenerkrankung (PKD) ist eine erblich bedingte Nephropathie. Sie zeigt sich in einer zystischen Degeneration des Nierenparenchyms¹, die zu einem Verlust der normalen Nierenarchitektur führt². Die dadurch bedingte Einschränkung der Nierenfunktion resultiert terminal in einem vollständigen Funktionsverlust. Die PKD kann beim Menschen bereits vor der Geburt in Form der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung, während der Kindheit oder der Pubertät in Form, der Nephronophthie oder aber im Erwachsenenalter in der häufigsten Form der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung auftreten³. Auch bei der Katze, insbesondere bei Perserkatzen, ist die PKD beschrieben⁴.

2.1. Autosomal-rezessive Form der humanen PKD

Die ARPKD (autosomal-recessive polycystic kidney disease) tritt mit einer Prävalenz von 1:20.000 selten auf ⁵. Sie ist bedingt durch eine Mutation im Gen *PKHD1* (Chromosom 6, Genlokus 6p21.2-p12) ⁶. Das Genprodukt, das Membranprotein Fibrocystin/Polyductin, ist während der fetalen Phase in vielen verschiedenen Geweben zu finden und scheint eine Rolle in der Organentwicklung zu spielen. Später ist Fibrocystin/Polyductin vor allem in der Niere, in der Leber und in der Bauchspeicheldrüse exprimiert ⁷. In der Niere befindet es sich in der apikalen Zellmembran und im primären Zilium der Tubulusepithelzellen ^{8, 9}. Die spezifische Funktion von Fibrocystin/Polyductin ist bisher unzureichend charakterisiert.

Die Zystenentstehung dieser schnell progredienten Form der PKD beginnt bereits *in utero* ¹⁰. Neugeborene und Kleinkinder zeigen zystisch degenerierte und teilweise vergrößerte Nieren, eine kongenitale Leberfibrose sowie eine Lungenhypoplasie ^{3, 11}. Die perinatale Mortalität beträgt 30 bis 40 % ¹². Kinder, die das erste Jahr überleben, können eine Reihe von klinischen Problemen wie systemische und portale Hypertension, chronische Niereninsuffizienz und eine Hepatomegalie mit Leberfibrose entwickeln ¹⁰.

2.2. Autosomal-dominante Form der humanen PKD

Die ADPKD (autosomal-dominant polycystic kidney disease) ist mit einer Prävalenz von 1:500 bis 1:1000 eine der häufigsten hereditären Erkrankungen des Menschen ¹³. Sie ist im Gegensatz zur autosomal-rezessiven Form der PKD langsam progressiv und wird meist erst im Alter von 30 bis 40 Jahren als Zufallsbefund erhoben ¹³. Durch den progredienten Verlust funktionsfähiger Nephrone erreichen über 50 % der Patienten in einem Alter von 60 bis 70 Jahren das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz ^{14, 15}. Die zunehmende Zahl und Größe flüssigkeitsgefüllter Zysten und die dadurch bedingte Entzündung und Fibrose des Nierenparenchyms führen mit dem Fortschreiten der Erkrankung zu einer massiven Größen- und Gewichtszunahme der Niere ¹⁶ (Abbildung 2). Tubulointerstitielle Nephritis, Zystenruptur, bakterielle Infektionen des Zysteninhalts, immer wieder auftretende Harnwegsinfekte und Urolithiasis sind typische Komplikationen dieser Erkrankung ¹³. Trotz der hauptsächlich renalen Manifestation ist die ADPKD als systemische Erkrankung zu betrachten. Typischerweise finden sich extrarenale Zysten ¹⁷ vor allem in der Leber und in der Bauchspeicheldrüse. Daneben können intrakranielle Aneurysmen ¹⁸, arterielle Hypertonie und Herzklappeninsuffizienzen als mögliche Komplikationen auftreten ¹⁹.

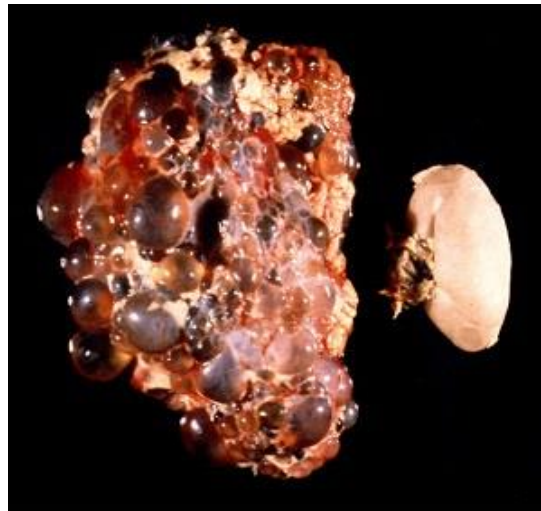


ABBILDUNG 2: Vergleich einer polyzystischen Niere mit einer gesunden Niere. Links polyzystisch degenerierte Niere, rechts gesunde Niere eines Erwachsenen (Physiologisches Institut, Universität Zürich).

Ursache der ADPKD sind Mutationen zweier Gene - *PKD1* und *PKD2*. Die Mutation des Gens *PKD1* (Chromosom 16, Genlokus 16p13.3) betrifft 85 % der Patienten ⁴. Es kodiert für das integrale Membranprotein Polycystin-1 ¹³. Circa 15 % der Patienten zeigen eine Mutation im Gen *PKD2* (Chromosom 4, Genlokus 4q21-23) ¹³. Es kodiert für das integrale Membranprotein Polycystin-2 ²⁰. Das Zystenwachstum beginnt bei einer Mutation im Gen *PKD2* später und die Erkrankung verläuft milder als bei Personen mit einer Mutation im Gen *PKD1*. Sie werden folglich später mit Beschwerden wie Rücken- und Flankenschmerzen vorstellig, Komplikationen treten seltener auf und die Nierenfunktion bleibt länger erhalten ¹⁴.

Das integrale Membranprotein Polycystin-1 (Genprodukt von *PKD1*) ist ein Rezeptor oder ein Adhäsionsprotein ²¹. Es wird vermutlich in allen Bereichen des Nephrons exprimiert ²². Polycystin-1 ist auf zellulärer Ebene im primären Zilium ²³ und in der apikalen Zellmembran der Epithelzellen im distalen Tubulus sowie im Sammelrohr zu finden ²⁴. Polycystin-2 (Genprodukt von *PKD2*) scheint als nicht selektiver Kationen-Kanal mit einer hohen Permeabilität für Kalzium zu fungieren. Er ist durchlässig für Kalzium aus dem Extrazellulärraum und setzt Kalzium aus intrazellulären Speichern frei ²⁵. Polycystin-2 wird in der Niere, im Herzen und in der Gefäßmuskulatur produziert ²⁶. Intrazellulär ist Polycystin-2 im endoplasmatischen Retikulum zu finden und interagiert dort mit anderen Kalziumkanälen ²⁷. Zusammen mit Polycystin-1 ist es als Komplex im primären Zilium lokalisiert ²⁸.

2.3. Polyzystische Nierenerkrankung im Tierreich

Polyzystische Nierenveränderungen sind auch bei verschiedenen Tierarten wie zum Beispiel bei Rind, Ziege, Kaninchen, Hund, Frettchen und Nerz beschrieben. Vor allem bei der Hauskatze, insbesondere bei Perserkatzen und ihren Verwandten²⁹, ist die PKD eine wichtige Differentialdiagnose beim Auftreten unregelmäßig vergrößerter Nieren. Weltweit sind circa 37 % aller Perserkatzen betroffen⁴. Bei der Hauskatze beginnt die Zystenentstehung ohne Geschlechtsdisposition bereits beim Jungtier und führt im Alter von circa 7 Jahren zu einer chronischen Niereninsuffizienz mit terminalem Nierenversagen³⁰. Klinische Symptome können fehlen, sind unspezifisch oder von denen einer chronischen Niereninsuffizienz anderer Genese nicht zu unterscheiden, was die Diagnosestellung erschwert. Histologisch entspricht die polyzystische Nierenerkrankung der Katze der humanen ADPKD. Neben der Niere sind die Leber und die Bauchspeicheldrüse von Zystenbildung betroffen³¹. Darüber hinaus finden sich herdförmige interstitielle Nephritiden und Fibrosen des Nierenparenchyms.

2.4. Pathogenese der Zystenentstehung

Die Pathogenese der Zystenentstehung ist bis heute nicht gänzlich verstanden. Durch die Lokalisation nahezu aller bei der PKD betroffenen Genprodukte auf dem primären Zilium geht man aber davon aus, dass dieses eine bedeutende Rolle in der Zystenentstehung spielt³². Infolgedessen werden die polyzystischen Nierenerkrankungen auch als Ziliopathien bezeichnet³³. Das primäre Zilium sitzt auf der luminalen Zellmembran der meisten Epithelzellen in Niere, Leber und Bauchspeicheldrüse sowie auf der luminalen Zellmembran der glatten Muskelzellen und vermutlich auch der Endothelzellen²². Es ist ein nicht aktiv bewegliches haarartiges Zellorganell, das in der Niere als Mechanorezeptor der Messung des Harnstroms im Tubuluslumen dient¹. Der Polycystin-Komplex verarbeitet diese Signale und führt zu einer variablen Öffnung der Kalziumkanäle²². Ferner ist das primäre Zilium über die Regulation der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Adhäsion der Epithelzellen mitverantwortlich für deren korrekte Funktion und es nimmt über die Kontrolle des Tubuluslumens Einfluss auf die Zystenentstehung³⁴. Ein veränderter oder fehlender Polycystin-Komplex führt zu einer gestörten Kalzium-Homöostase in der Zelle²², die wiederum in einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel resultiert²⁶. Ein gesteigerter Vasopressin-Spiegel im Blut und eine abnorme Expression sowie Stimulation des renalen Vasopressin-Rezeptors verstärken die Akkumulation von cAMP im Zytoplasma³⁵⁻³⁸. Die durch cAMP gesteigerte Proliferation und verminderte Differenzierung der Tubulusepithelzellen³⁹ führt zur Ausbildung von Zysten in jedem Segment des Nephrons, vor allem aber in distalen Tubulus und im Sammelrohr⁴⁰. Eine erhöhte Sekretion von Flüssigkeit in das Zystenlumen, die ebenfalls durch cAMP gefördert wird¹³, beschleunigt das massive Wachstum der Zysten^{41, 42}. Die zystische Degeneration breitet sich über das gesamte Nierenparenchym aus, führt zu einer Druckatrophie der umliegenden intakten Nephrone und fördert die Einlagerung von Kollagenfasern zur Stabilisierung des Gewebes. Dieser Prozess resultiert in entzündlichen und fibrotischen Veränderungen des Nierenparenchyms⁴³. Ferner bedingen die zunehmende Anzahl und Größe der Zysten eine Volumen- und Gewichtszunahme der Nieren¹⁶ (Abbildung 2).

Wie bereits beschrieben spielt cAMP eine zentrale Rolle in der Entstehung und im Wachstum der Zysten. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wird besonders über die Adenylatzyklase moduliert, deren Aktivität durch Vasopressin beeinflusst wird.

3. Therapieansatz Vasopressin-Rezeptor

3.1. Vasopressin und sein Rezeptor

Vasopressin (auch antidiuretisches Hormon oder Arginin-Vasopressin) ist ein aus neun Aminosäuren bestehendes Peptidhormon. Es wird im *Nucleus supraopticus* und im *Nucleus paraventricularis* im Hypothalamus produziert, axonal in die Neurohypophyse transportiert, dort gespeichert und bei Bedarf in das Blut abgegeben. Die Wirkung von Vasopressin wird über die Vasopressin-Rezeptoren vermittelt. Sie gehören zur Proteinsuperfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Es sind drei Subtypen dieses Rezeptors beschrieben: V1aR, V1bR und V2R. Ihre Lokalisation und Funktion sind im Detail in Tabelle 1 erläutert.

TABELLE 1: Subtypen des Vasopressin-Rezeptors. Übersicht über Lokalisation und Effekte der einzelnen Subtypen.

Subtyp	Lokalisation	Effekt in der Zelle	Effekt im Körper
V1aR	Glatte Gefäßmuskulatur Hepatozyten Myometrium Thrombozyten	Phospholipase C > Kalzium ↑	Vasokonstriktion > Blutdruck ↑ Glykogenolyse Uteruskontraktion Thrombozytenaggregation
V1bR	Adenohypophyse	Phospholipase C > Kalzium ↑	Ausschüttung von ACTH
V2R	Epithelzellen der Sammelrohre in der Niere Glatte Gefäßmuskulatur	Adenylatzyklase > cAMP ↑	Insertion von Aquaporin-2 in die luminale Zellmembran > Antidiurese, Ausscheidung eines hyperosmolaren Urins Vasodilatation

Der intrazelluläre Signaltransduktionsweg am V1a-Rezeptor und am V1b-Rezeptor ist an das G-Protein $G_{q/11}$ gekoppelt und resultiert in einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels und in einer Aktivierung der Proteinkinase C, die wiederum Effekte wie die Vasokonstriktion vermittelt ⁴⁴. Der Signaltransduktionsweg ist in Abbildung 3 dargestellt.

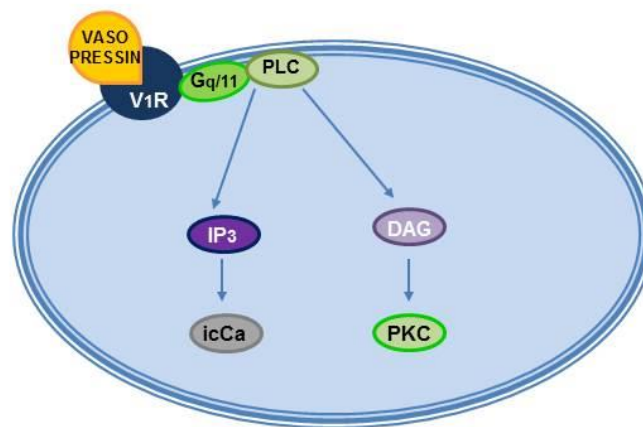


ABBILDUNG 3: Intrazellulärer Signaltransduktionsweg am V1-Rezeptor. Die Bindung von Vasopressin an den V1-Rezeptor aktiviert über das G-Protein $G_{q/11}$ die Phospholipase C (PLC). Dieses Enzym setzt die Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) frei. IP_3 bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Spiegels (icCa). Über den Botenstoff DAG wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (modifiziert nach American Heart Association, www.ahajournals.org).

Der V2-Rezeptor interagiert mit dem G-Protein G_s . Die intrazelluläre Signalkaskade resultiert in einem vermehrten Einbau des Wasserkanals Aquaporin-2 in die luminale Zellmembran der Tubulusepithelzellen. Durch die so erhöhte Wasser-Permeabilität der Zellmembran steigt die Resorption von Wasser aus dem Harn ⁴⁴. Der Signaltransduktionsweg ist in Abbildung 4 dargestellt.

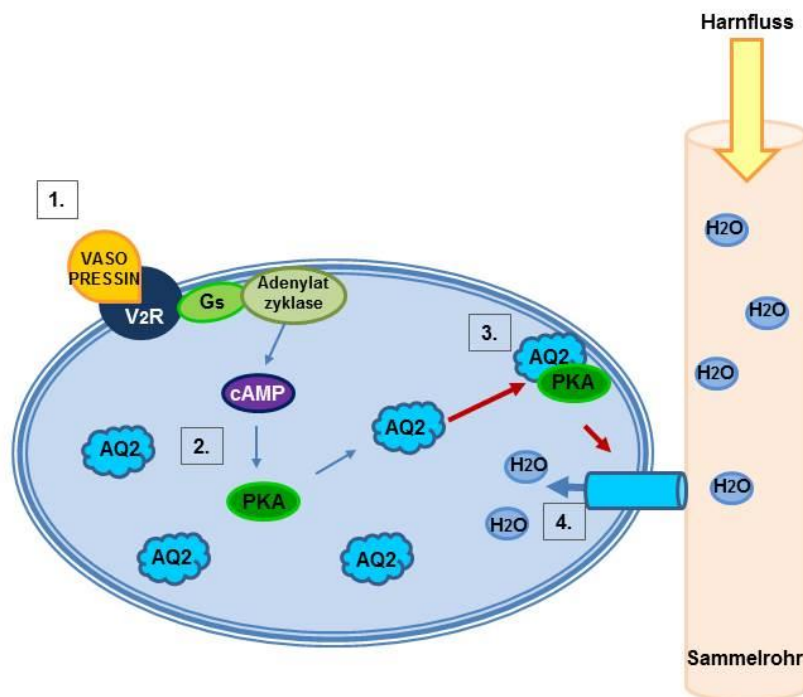


ABBILDUNG 4: Signaltransduktionsweg am V2-Rezeptor in einer Epithelzelle des Sammelrohrs.

1. Die Bindung von Vasopressin an den V2-Rezeptor aktiviert über das G-Protein G_s die Adenylatzyklase. Dieses Enzym bildet aus ATP den Botenstoff cAMP, welcher 2. wiederum die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) erhöht. 3. Die PKA baut das in intrazellulären Vesikeln gespeicherte Aquaporin-2 (AQ2) über Fusion in die Zellmembran ein. 4. Dadurch wird die Wasser-Permeabilität der luminalen Zellmembran der Epithelzelle gesteigert und in der Folge vermehrt Wasser (H_2O) aus dem Harn resorbiert (modifiziert nach American Heart Association, www.ahajournals.org).

Der Ein- und Ausbau von Aquaporin-2 unter dem Einfluss von Vasopressin moduliert bedarfsgerecht die Wasserdurchlässigkeit der luminalen Zellmembran und damit die Fähigkeit des distalen Tubulus und vor allem des Sammelrohrs zur Wasserresorption. Sensoren im Hypothalamus überwachen die Osmolarität und Sensoren im rechten Vorhof und im Aortenbogen das Volumen des Bluts. Abweichungen führen zu einer vermehrten Sekretion von Vasopressin.

Der Fokus der vorliegenden Studie liegt auf dem V2-Rezeptor. Er ist in der Niere vor allem im distalen Tubulus und im Sammelrohr lokalisiert und ist im direkten Zusammenhang mit der Zystenbildung zu sehen⁴⁰. Daher wird im Folgenden nur auf den V2-Rezeptor genauer eingegangen.

3.2. Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten

Wie bereits in II.2.4 näher erläutert, führt die erhöhte Aktivität der Adenylatzyklase zu einer Akkumulation von cAMP im Zytoplasma ³⁵. Über eine Störung der Tubulogenese und eine Stimulation der Zellproliferation des Zystenepithels sowie der Sekretion in das Zystenlumen fördert cAMP die Bildung und das Wachstum von Zysten ¹³. Über den V2-Rezeptor ist Vasopressin der wichtigste Agonist für die Aktivierung der Adenylatzyklase. Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten blockieren kompetitiv den V2-Rezeptor, so dass die Bindung von Vasopressin nicht mehr oder nur noch in geringem Maße möglich ist und der intrazelluläre cAMP-Spiegel niedrig bleibt ⁴⁵. Der V2-Rezeptor ist in der Niere mit den am häufigsten von Zystenbildung betroffenen Bereichen – dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr - kolokalisiert. Mit einer Blockade des V2-Rezeptors gelangt man also direkt in den Hauptausprägungsbereich der Zysten und unerwünschte Wirkungen werden durch die selektive Blockade des V2-Rezeptors und durch seine exklusiv renale Expression minimiert ⁴⁶.

In mehreren Tiermodellen der PKD konnte nachgewiesen werden, dass der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 den cAMP-Spiegel in der zystisch veränderten Niere senkt und einen protektiven Effekt auf die Niere ausübt. Dies zeigte sich in einer verminderten Ausprägung der Zysten und einer reduzierten Fibrose im Nierenparenchym, die mit einer geringeren Zunahme des Nierengewichts einhergingen ^{26, 47, 48}. Auch der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Tolvaptan – ein Derivat des OPC-31260 - zeigte im Tiermodell ⁴⁹ und in klinischen Studien einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf ^{50, 51}.

4. Zielsetzung

cAMP spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung und im Wachstum renaler Zysten. Sein Einfluss wirkt vorrangig über die Proliferation der Tubulusepithelzellen und die Flüssigkeitssekretion in das Zystenlumen^{13, 52}. Da der intrazelluläre cAMP-Spiegel in zystisch veränderten Nieren im Vergleich zu gesunden Nieren erhöht ist⁵³, ist die Reduktion des cAMP-Spiegels ein möglicher Weg zur Behandlung der PKD. Physiologischerweise erhöht Vasopressin über den V2-Rezeptor den cAMP-Spiegel in der Zelle. Eine Blockade dieses Rezeptors minimiert die Bindung von Vasopressin und damit den intrazellulären cAMP-Spiegel. Die Wirksamkeit der Vasopressin-Rezeptor-Blockade wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen^{50, 54}. Von den bisher verwendeten Substanzen zeigten OPC-31260 (internationaler Freiname: Mozavaptan) und sein Derivat OPC-41061 (internationaler Freiname: Tolvaptan) einen protektiven Effekt auf die Niere⁵⁵. In einer aktuellen klinischen Studie traten jedoch nachteilige Effekte von Tolvaptan auf. Neben weniger kritischen Symptomen wie vermehrtem Durst, Polydipsie und Polyurie wurde eine ernstzunehmende Erhöhung der Leberenzyme beobachtet⁵⁰. Infolgedessen ist es notwendig, auch andere Stoffklassen auf potentielle Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten zu durchsuchen. Eine Forschergruppe aus Frankreich (Nicolas Gilles, CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich) überprüfte das Gift der Blattgrünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) auf mögliche Aktivität am V2-Rezeptor und konnte einen hoch-potenten selektiven Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten identifizieren: Mambaquaretin-1 zeigte in einer renalen Zelllinie eine hohe Affinität für den V2-Rezeptor und blockierte ihn auch nach Zugabe von Vasopressin vollständig (unveröffentlichte Daten).

Ziel dieser Studie ist es, die in der Zellkultur beschriebene Wirksamkeit von Mambaquaretin-1 erstmals in einem Mausmodell der PKD zu bestätigen. Es soll gezeigt werden, dass Mambaquaretin-1 den V2-Rezeptor auch *in vivo* sicher blockiert und durch den daraus resultierenden erniedrigten cAMP-Spiegel die Zystenbildung reduziert. Als Positivkontrolle dient der bereits untersuchte Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260^{26, 47, 56}. Darüber hinaus soll gezeigt werden, dass eine Stimulation des V2-Rezeptors über den Vasopressin-Rezeptor-Agonisten MCF-264 die Zystenbildung intensiviert.

Folgende Schritte sollen zur Bestätigung der Hypothesen dienen:

- *Prüfung der dosisabhängigen Wirkung der verwendeten Substanzen auf Volumen und Osmolalität des Urins in einem Mausmodell der PKD*

Durch die Blockade des V2-Rezeptors werden auch die Mechanismen der Aquaporin-2-Insertion und die Resorption von Wasser außer Kraft gesetzt und somit die Ausscheidung reinen Wassers mit dem Urin gesteigert. Es ist also anzunehmen, dass die mit einem Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten behandelten Mäuse eine deutliche Erhöhung des Urinvolumens mit gleichzeitiger Verminderung der Urinosmolalität zeigen. Zunächst soll vor Beginn der Therapiestudie geprüft werden, wie die verwendeten Substanzen Urinvolumen und Urinosmolalität dosisabhängig verändern und dabei soll die Dosis für die sich anschließende Therapiestudie ermittelt werden.

- *Effekte der verwendeten Substanzen auf die Funktion der Niere im Verlauf der Therapiestudie*

Über die Dauer der Therapiestudie von 100 Tagen werden mehrfach Urinproben genommen, um Volumen und Osmolalität zu messen. Zur Überprüfung, ob es sich tatsächlich um eine vermehrte Ausscheidung von reinem Wasser handelt oder ob es zu einem Verlust von Elektrolyten kommt, wird die Konzentration verschiedener Elektrolyte in allen Urinproben gemessen. Auch sollen die Nierenfunktionsparameter Harnstoff und Kreatinin sowie das Gesamtprotein im Urin Aufschluss über die Funktionalität der Niere und die Unversehrtheit des glomerulären Filters geben. Außerdem werden die Nierenfunktionsparameter Harnstoff und Kreatinin im Blutplasma gemessen.

- *Effekte der verwendeten Substanzen auf die Morphologie der zystisch degenerierten Niere*

Im Weiteren sollen die Effekte der verwendeten Substanzen auf die Morphologie der Niere untersucht werden. Hierzu werden die Nieren am Versuchende entnommen und hinsichtlich der zystischen und fibrotischen Veränderungen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind von klinischer Relevanz, da die Möglichkeiten für eine erfolgreiche und kausale Therapie der polyzystischen Nierenerkrankung bisher noch unzureichend untersucht sind.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Verwendetes Mausmodell und Haltungsbedingungen der Tiere

Die Studie wurde mit weiblichen CD1^{pcy/pcy} Mäusen durchgeführt. Erstmals beschrieben wurde diese Mauslinie 1986 von Takahashi⁵⁷. Sie entwickelte sich durch eine spontane Mutation aus der KK-Linie, einem Modell für Diabetes mellitus. Im Gegensatz zu der ursprünglichen Linie zeigen die CD1^{pcy/pcy} Mäuse normale Blutglukose-Werte⁵⁷. Die Zystenentstehung ist bedingt durch eine Mutation des Gens *NPHP3* (lokalisiert auf Chromosom 9), die autosomal-rezessiv vererbt wird. Das Genprodukt Nephrocystin-3 wurde im primären Zilium der Epithelzellen in der Niere, in der Bauchspeicheldrüse, in Herz und Leber nachgewiesen. Nephrocystin-3 ist für deren normale Entwicklung und Funktion von Bedeutung⁵⁸. Die CD1^{pcy/pcy} Maus zeigt eine langsam progressive Form der ARPKD, die in ihrem Verlauf mit der humanen ADPKD vergleichbar ist⁵⁷. Es bilden sich in allen Bereichen der Niere vor allem aber im distalen Tubulus und im Sammelrohr Zysten aus, die von Entzündung und Fibrose des Nierenparenchyms begleitet werden⁵⁹. Bereits bei Neugeborenen sind erste Hinweise auf Zystenbildung zu sehen. Die Tiere erreichen aufgrund eines terminalen Nierenversagens nur ein Alter von 8 bis 12 Monaten.

Alle im Versuch verwendeten Mäuse wurden gemäß dem Tierschutzgesetz und unter Standardbedingungen in Gruppen von 6 bis 7 Tieren in der Versuchstiereinheit des Vorklinikums der Universität Regensburg gehalten. Die Pflege und Unterbringung der Tiere in den Einrichtungen der Universität Regensburg entsprechen den gesetzlichen Vorgaben (EU Richtlinie 2010/63/EU, Anhang III). Die Tiere hatten Leitungswasser und pelletiertes Standardfutter für Labortiere (Nagerfutter der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) *ad libitum* zur Verfügung. Zur individuellen Kennzeichnung trugen die Mäuse Tätowierungen der Fußballen. Alle zur Studie notwendigen Versuche und Untersuchungsmethoden sind von der Regierung der Oberpfalz genehmigt (Aktenzeichen 54-2532.1-12/11).

2. Medikation

2.1. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264

MCF-264 (zur Verfügung gestellt von Nicolas Gilles, CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich) mit der chemischen Summenformel $C_{22}H_{19}ClN_6O$ hat ein Molekulargewicht von 418,88 g/mol. MCF-264 löst sich mit einer Konzentration von 4,18 mg/ml (entsprechend 9,99 µmol/ml) in 100 % DMSO. Da 100 % DMSO starke unerwünschte Wirkungen aufweist, wurde die Stammlösung mit isotoner Kochsalzlösung auf 4 % DMSO verdünnt (entsprechend 167 µg MCF-264/ml). Die Wirkung als kompetitiver partieller Vasopressin-Rezeptor-Agonist vermittelt MCF-264, selektiv über den V2-Rezeptor.

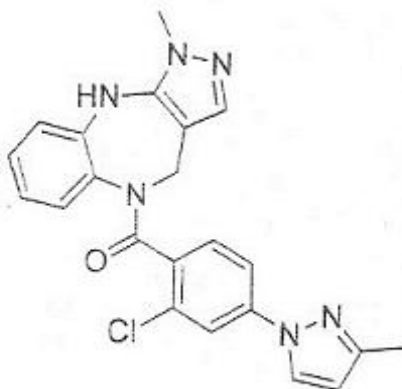


ABBILDUNG 5: Chemische Struktur von MCF-264. Zur Verfügung gestellt von Nicolas Gilles (CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich).

2.2. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260

OPC-31260 (zur Verfügung gestellt von Nicolas Gilles, CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich) mit der chemischen Summenformel $C_{27}H_{29}N_3O_2$ ist ein Benzazepin-Derivat⁵⁶. Es hat ein Molekulargewicht von 427,54 g/mol und löst sich in einer Konzentration von 4,27 mg/ml (entsprechend 9,99 $\mu\text{mol/ml}$) in 100 % DMSO. Die Stammlösung wurde für OPC-31260 mit isotoner Kochsalzlösung auf 4 % DMSO verdünnt (entsprechend 170 μg OPC-31260/ml). OPC-31260 (internationaler Freiname: Mozavaptan) ist ein Vasopressin-Rezeptor-Antagonist, selektiv für den V2-Rezeptor⁵⁶. In der vorliegenden Studie dient OPC-31260 aufgrund seines in mehreren Studien nachgewiesenen protektiven Effekts auf die Niere als Orientierung und Positivkontrolle^{47, 48, 56}.

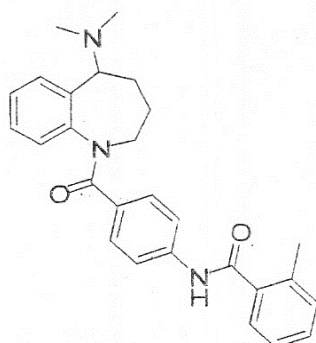


ABBILDUNG 6: Chemische Struktur von OPC-31260. Zur Verfügung gestellt von Nicolas Gilles (CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich).

2.3. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1

Mambaquaretin-1 (zur Verfügung gestellt von Nicolas Gilles, CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich) ist ein aus 57 Aminosäuren bestehendes Dendrotoxin, isoliert aus dem Gift der Blattgrünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*). Die Dendrotoxine sind eine Gruppe von kleinen Peptiden aus dem Gift der Mambas, die präsynaptisch als Neurotoxine fungieren und sehr potente selektive Antagonisten verschiedener Ionenkanäle sind ⁶⁰. Mambaquaretin-1 ist ein kompetitiver Vasopressin-Rezeptor-Antagonist, selektiv für den V2-Rezeptor. Auf Zellebene blockierte Mambaquaretin-1 den V2-Rezeptor auch nach Zugabe von Vasopressin vollständig (Nicolas Gilles, CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich, unveröffentlichte Daten). Es hat ein Molekulargewicht von 6371 g/mol und wurde für die vorliegende Studie in einer Konzentration von 1 mg/ml (entsprechend 0,16 µmol/ml) in isotoner Kochsalzlösung gelöst.

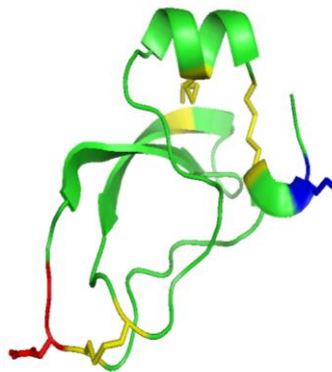


ABBILDUNG 7: Quartärstruktur von Mambaquaretin-1. Zur Verfügung gestellt von Nicolas Gilles (CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich).

3. Versuchsaufbau: Therapiestudie und Versuch zur Dosisfindung

Zur Therapiestudie wurden 35 weibliche CD1^{pcy/pcy} Mäuse im Alter von 10 Wochen, wie in Tabelle 2 dargestellt, zufällig in fünf Gruppen eingeteilt.

TABELLE 2: Gruppeneinteilung der Therapiestudie.

Verumgruppe	Kontrollgruppe
MCF-264	4 % DMSO/isotone Kochsalzlösung
OPC-31260	
Mambaquaretin-1	Isotone Kochsalzlösung

Die Mäuse erhielten die Wirkstoffe in einer Dosis von 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ über einen Zeitraum von 100 Tagen 1x täglich intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppen erhielten 0,1 ml des jeweiligen Lösungsmittels. Durch die unterschiedliche Löslichkeit der einzelnen Wirkstoffe waren zwei Kontrollgruppen nötig. MCF-264 (Gruppe aus 6 Mäusen) und OPC-31260 (Gruppe aus 7 Mäusen) wurden mit der Kontrollgruppe „4 % DMSO“ (Gruppe aus 7 Mäusen) verglichen, Mambaquaretin-1 (Gruppe aus 6 Mäusen) mit der Kontrollgruppe „isotone Kochsalzlösung“ (Gruppe aus 7 Mäusen).

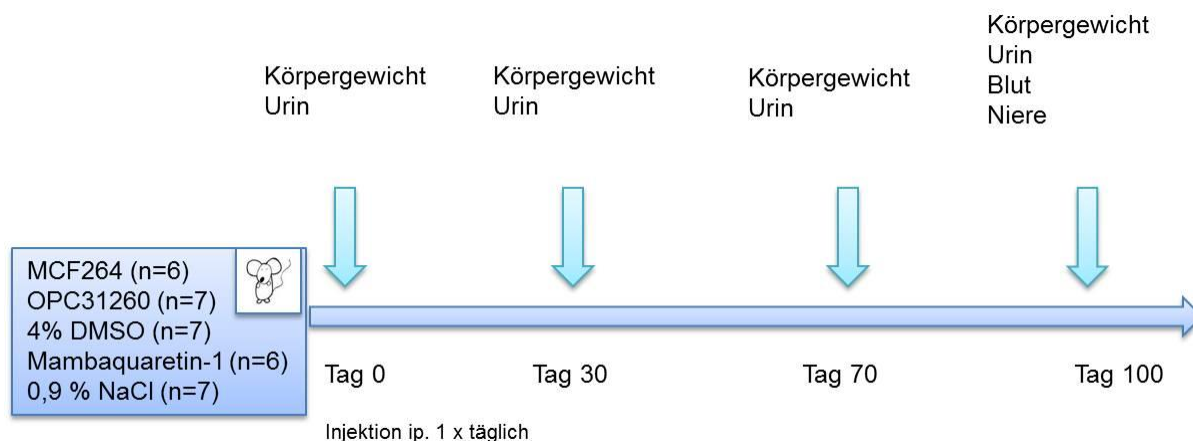


ABBILDUNG 8: Versuchsaufbau. Übersicht über die gemessenen Parameter und die Messzeitpunkte.

Vor der eigentlichen Therapiestudie wurden die optimale Dosis der zu testenden Substanzen und ihre Applikationsart anhand des dosisabhängigen Effekts auf Volumen und Osmolalität des Urins festgelegt. Um diese zu ermitteln, erhielten 10 weibliche CD1^{pcy/pcy} Mäuse an vier aufeinanderfolgenden Tagen je eine Substanz als intraperitoneale oder subkutane Injektion. Eine Übersicht ist in Tabelle 3 dargestellt.

TABELLE 3: Versuch zur Dosisfindung. Übersicht über die untersuchten Dosierungen und Applikationsarten für MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1.

Substanz	Dosierung	Applikationsart
MCF-264	10 $\mu\text{mol/kg}$	sc., ip.
	20 $\mu\text{mol/kg}$	sc., ip.
OPC-31260	1 $\mu\text{mol/kg}$	sc., ip.
	10 $\mu\text{mol/kg}$	sc., ip.
Mambaquaretin-1	0,01 $\mu\text{mol/kg}$	ip.
	0,1 $\mu\text{mol/kg}$	ip.
	1 $\mu\text{mol/kg}$	sc., ip.

Zusätzlich wurde der diuretische Effekt von Mambaquaretin-1 auch an gesunden weiblichen C57BL/6 Mäusen untersucht. Sie erhielten eine Dosis von 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ als tägliche intraperitoneale Injektion an vier aufeinanderfolgenden Tagen.

4. Urinuntersuchung

Zur Gewinnung von Sammelurinproben verbrachten die Mäuse einzeln 24 Stunden in metabolischen Käfigen (Stoffwechselkäfige für kleine Nager, Tecniplast, Ehret, Mahlberg, Deutschland). Futter und Wasser standen ihnen *ad libitum* zur Verfügung. Der gesammelte Urin wurde 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um Schwebstoffe und Futterbestandteile zu entfernen. Zur Untersuchung der im Folgenden beschriebenen Parameter wurde nur der klare Flüssigkeitsüberstand verwendet. Im Verlauf des Versuchs zur Dosisfindung fanden ein, drei und fünf Tage (entsprechend Tag 2 | 4 | 6) nach der ersten Injektion Messungen statt. Im Rahmen der Therapiestudie wurde vor Versuchsbeginn und über einen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen bis zum Versuchsende mehrfach (Tag 0 | 30 | 70 | 100) Urin gesammelt. Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit gesammelten Urinproben wurden hinsichtlich ihres Volumens und der Osmolalität untersucht (siehe für Volumen III.4.1 und für Osmolalität III.4.2). Die während der Therapiestudie gesammelten Urinproben wurden darüber hinaus auch auf ihre Gehalte an Harnstoff (III.4.3), Kreatinin (III.4.4), Protein (III.4.5) und Elektrolyten (III.4.6) untersucht.

4.1. Bestimmung des Volumens

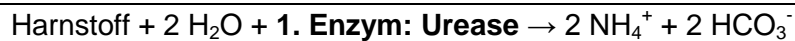
Das Urinvolumen wurde mit Hilfe einer Pipette (Pipetman P1000, P63617D und Pipetman P200, 259146A, Gilson S.A.S., Villiers, Frankreich) gemessen. Hierzu wurde anschließend an die Zentrifugation der Überstand mit einer Pipette aufgezogen und das entsprechende Volumen auf der Skala abgelesen. Die Urinproben wurden bis zur weiteren Bearbeitung in Mikroreaktionsgefäßen (2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -20 °C gelagert.

4.2. Messung der Osmolalität

Die Urinosmolalität wurde mit Hilfe eines Osmometers (KNAUER Osmometer Automatic RS45105-0, KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Deutschland) gemessen. Dazu wurde nach der Messung des Urinvolumens eine vom Gerät vorgegebene definierte Menge Urin in die Messküvette überführt und die Osmolalität über die Messung der Gefrierpunktniedrigung bestimmt.

4.3. Analyse der Harnstoffkonzentration

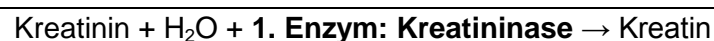
Die Messung der Harnstoffkonzentration im Urin erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (LT-SYS® Harnstoff-Kit, Labor + Technik, Eberhard Lehmann GmbH, Berlin, Deutschland), der eine vollenzymatische UV-Methode nutzt.



Je Vertiefung einer auf 37 °C vorgewärmten 96-Loch-Platte wurden 2 µl der im Verhältnis 1:100 verdünnten Urinproben pipettiert. In jede Vertiefung wurden 200 µl der Enzym-Substrat-Lösung hinzugegeben. Die Abnahme von NADH konnte nach 30 sec und nach 60 sec bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch gemessen werden. Bei jedem Ansatz fand auch eine Messung einer Standardlösung mit einer definierten Harnstoffkonzentration statt. Die Harnstoffkonzentration der Urinproben wurde anschließend mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

4.4. Analyse der Kreatininkonzentration

Zur Messung der Kreatininkonzentration im Urin wurde ein kommerziell erhältlicher Kit (LT-SYS® Kreatinin-Kit, Labor + Technik, Eberhard Lehmann GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Er beruht auf einer enzymatischen Umsetzung von Kreatinin, die eine Farbreaktion zu Folge hat.



In jede Vertiefung einer auf 37 °C vorgewärmten 96-Loch-Platte wurden 10 µl der im Verhältnis 1:10 verdünnten Urinproben und je 200 µl von Reagenz 1 pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C fand die erste Messung bei 564 nm statt. Danach wurden je Vertiefung 40 µl von Reagenz 2 hinzugefügt.

Die zweite Messung bei 564 nm fand nach 20 min Inkubation bei 37 °C statt. Bei jedem Ansatz wurde auch eine Standardkurve gemessen, um anschließend die Kreatininkonzentration der Urinproben zu berechnen.

4.5. Analyse der Proteinkonzentration

Das Gesamtprotein im Urin wurde quantitativ mit Hilfe des Bicinchoninsäure-Assay nach Pierce bestimmt. Dieser Methode liegt eine Farbreaktion zugrunde. Cu^{2+} -Ionen werden durch das zu bestimmende Protein zu Cu^+ -Ionen reduziert. Jeweils ein Cu^+ -Ion bildet mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen einen violetten Farbkomplex, der photometrisch bei 562 nm gemessen werden kann. Dieser Reaktionsschritt ist in Abbildung 9 dargestellt. Mit Hilfe eines Proteins, dessen Menge bekannt ist, konnte eine Standardkurve zur Bestimmung der Messwerte angefertigt werden.

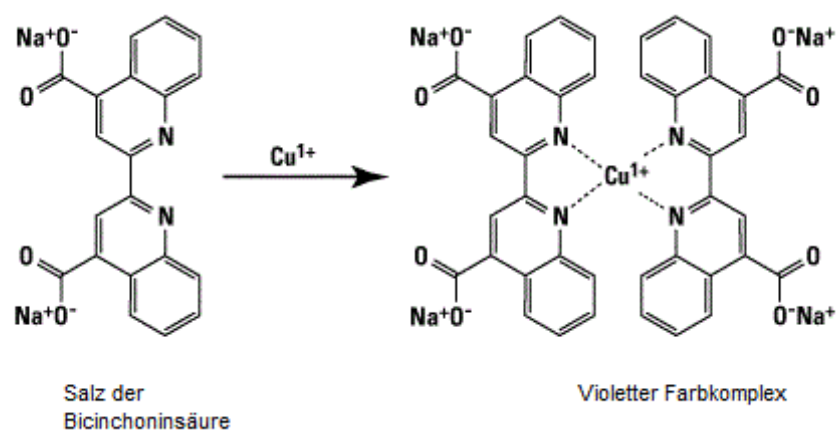


ABBILDUNG 9: Farbreaktion nach Pierce. Ein Cu^+ -Ion bildet mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex (modifiziert nach www.piercenet.com).

4.6. Analyse der Elektrolytkonzentration

Die Messung der Elektrolyte Natrium, Kalium, Ammonium, Chlorid, Phosphat und Sulfat wurde von Herrn Dr. Sascha Bandulik vom Institut für Physiologie – Medizinische Zellbiologie an der Universität Regensburg durchgeführt. Dazu dient eine Leitfähigkeitsmessung nach chromatographischer Auftrennung über eine Ionenaustausch-Säule (ICS-1600-System, ICS-3000 Autosampler, Dionex/ Thermo Fisher Scientific, Idstein, Deutschland) ⁶¹. Die gemessenen Konzentrationen wurden je nach Ladung der Elektrolyte als Kationen oder Anionen summiert.

5. Blutentnahme und Plasma-Analyse

An Tag 100 erfolgte die Blutentnahme am wachen Tier und unter Allgemeinanästhesie. Das Blut wurde in mit Heparin beschichtete Mikroprobengefäße (0,5 ml Microvetten, beschichtet mit Lithium-Heparin, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) überführt und bei 4.500 rpm 10 min zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung in Mikroreaktionsgefäßen (1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei – 20 °C gelagert.

5.1. Blutentnahme am wachen Tier

Die Blutentnahme am wachen Tier erfolgte aus der *Vena facialis*. Die Mäuse wurden im Nacken fixiert, um eine Stauung der Vene zu erreichen. Mit einer Kanüle konnte die *Vena facialis* im Unterkieferbereich punktiert und das austretende Blut mit einer mit Heparin beschichteten Glaskapillare (Micro-Haematocrit, beschichtet mit Natrium-Heparin, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) aufgenommen werden. Die weitere Behandlung erfolgte wie in III.5 beschrieben.

5.2. Blutentnahme unter Allgemeinanästhesie

Zur Blutentnahme unter Allgemeinanästhesie wurden die Mäuse zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital in einer Dosierung von 50 mg/kg (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) narkotisiert. Nach Erreichen einer chirurgischen Toleranz wurde mit Hilfe von mit Heparin beschichteten Glaskapillaren (Micro-Haematocrit, beschichtet mit Natrium-Heparin, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Die weitere Behandlung erfolgte wie in III.5 beschrieben.

5.3. Analyse der Harnstoff- und Kreatininkonzentration

Im Blutplasma wurden die Parameter Harnstoff und Kreatinin mit den für die Urinuntersuchung bereits in III.4.3 und III.4.4 beschriebenen Methoden gemessen.

6. Organaufarbeitung

6.1. Perfusionsfixierung und Organentnahme

Die narkotisierten (Pentobarbital, 50 mg/kg, Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) Mäuse wurden in Rückenlage fixiert und das Abdomen entlang der *Linea alba* vom Becken bis zum Brustbein eröffnet. Nach der Auslagerung des Darmkonvoluts wurden beide Nieren und die großen Bauchgefäße - *Aorta abdominalis* und *Vena cava caudalis* - dargestellt. Zur Organfixierung wurden die Mäuse 3 min mit 4 % PFA in 1x PBS retrograd über die *Aorta abdominalis* mit einem Druck von 180 bis 200 mmHg perfundiert. Bedingt durch den Blutverlust starben die Tiere. Beide Nieren und das Herz wurden entnommen und gewogen. Nach der Halbierung wurden die Nieren in 4 % PFA in 1x PBS bis zur weiteren Behandlung aufbewahrt.

6.2. Einbettung der Nieren in Paraffin

Die Nierenhälften wurden einzeln in Histologiekassetten umgelagert und nach Standardmethoden mit Hilfe eines Histokinette-Automaten (Einbettkarusell TP1020, Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) entwässert, imprägniert und mit Hilfe eines Einbettautomaten (EG 1150H, Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) in Paraffin eingebettet.

7. Histologie der Präparate

7.1. Herstellung der histologischen Paraffinschnitte

Mit Hilfe eines Mikrotoms (RM 2255, Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) wurden von jeder Niere mehrere 7 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Im anschließenden Wasserbad (41 °C) entfalteten sich die Präparate innerhalb von 3 bis 4 min. Im nächsten Schritt wurden zwei bis drei Präparate zusammen auf Objektträger (Superfrost®Plus, Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und 5 bis 10 min auf einer vorgeheizten Wärmeplatte (41 °C) getrocknet. Nach einer weiteren Trocknungszeit von 48 Stunden im Wärmeschrank (37 °C) lagerten die Schnitte bei Zimmertemperatur. Zur Vorbereitung der Präparate für die Färbung wurden sie nach in Tabelle 4 beschriebenem Protokoll entparaffiniert und hydriert.

TABELLE 4: Standardprotokoll zur Vorbereitung histologischer Präparate. Entparaffinierung und Hydrierung der Paraffinschnitte.

Lösung	Zeit
Xylol	2x 10 min
100 % Isopropanol	2x 2 min
96 % Isopropanol	2 min
80 % Isopropanol	2 min
70 % Isopropanol	2 min
50 % Isopropanol	2 min
<i>Aqua bidestillata</i>	2 min

7.2. Färbung der histologischen Schnitte

7.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Darstellung der Morphologie

Mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) lässt sich die Morphologie histologischer Präparate darstellen, da durch diese Färbemethode die Zell- und Gewebestrukturen farblich dargestellt werden können. Hämalau färbt die basophilen Strukturen, insbesondere Nukleinsäuren im Zellkern und das endoplasmatische Retikulum, blauviolett. Der saure Farbstoff Eosin färbt die acidophilen Strukturen wie zytoplasmatische Proteine und Kollagen rot bis rosa. Die Präparate wurden nach der Vorbereitung (Tabelle 4) nach dem klassischen Protokoll (Tabelle 5) gefärbt und fixiert.

TABELLE 5: Standardprotokoll der HE-Färbung.

Lösung	Zeit
Mayer's Hämalau	6 min
Leitungswasser, fließend	10 min
Eosin 0,1 % mit 3 Tropfen Eisessig	7 min
<i>Aqua bidestillata</i>	2 min
70 % Isopropanol	3 sec
80 % Isopropanol	3 sec
96 % Isopropanol	2 min
100 % Isopropanol	2x 2 min
Xylol	2x 10 min

7.2.2. Sirius-Rot-Färbung zur Darstellung fibrotischer Strukturen

Die Sirius-Rot-Färbung dient der Darstellung von Kollagenen und ermöglicht eine quantitative Analyse der Fibrose im Nierenparenchym. Muskulatur und Zytoplasma stellen sich gelb dar, kollagenes Bindegewebe zeigt sich rot gefärbt. Die Präparate wurden nach der Vorbereitung (Tabelle 4) nach dem klassischen Protokoll (Tabelle 6) gefärbt und fixiert.

TABELLE 6: Standardprotokoll der Sirius-Rot-Färbung.

Lösung	Zeit
Picro-Sirius-Rot	30 min
100 % Isopropanol	2x 2 min
Xylol	2x 10 min

7.3. Auswertung der histologischen Präparate

Die morphometrische Auswertung wurde mit Hilfe der Version 2012 der Software Image J vorgenommen (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, Maryland, USA) ⁶². Die gefärbten Schnitte der Nieren wurden zunächst einzeln fotografiert, mit der Auswertungssoftware geöffnet und in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt. Die Gesamtfläche der Niere wurde per Hand umrandet und gemessen. Um die Wertung von Glomerula als Zysten auszuschließen, wurden Hohlräume mit einer Mindestgröße von 0,05 mm² als Zysten definiert.

7.3.1. Morphometrische Analyse der zystischen Veränderungen im Nierenparenchym

Anhand der HE gefärbten Schnitte wurden jeweils für die linke und die rechte Niere folgende Parameter ermittelt:

- Gesamtfläche des Anschnitts der Niere und Gesamtfläche der Zysten → Berechnung der relativen Zystenfläche
- Anzahl der Zysten → Berechnung der Zystenanzahl im Bezug zur Nierenfläche
- Größe der einzelnen Zysten → Berechnung der mittleren Zystengröße.

7.3.2. Morphometrische Analyse der fibrotischen Veränderungen im Nierenparenchym

Anhand der Sirius-Rot gefärbten Schnitte wurden jeweils für die linke und die rechte Niere die gesamte Fläche der Niere und der Fibrose im Nierenparenchym ermittelt. Diese Werte dienten der Berechnung der relativen Fibrosefläche.

8. Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit der Version 21 von IBM SPSS Statistics (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ausgewertet und die Versuchsgruppen mit der entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Zunächst wurde eine deskriptive Statistik mit Mittelwert (MW), Median, Standardabweichung (SD) und 95 % Konfidenzintervall erstellt. Der Kolmogorow Smirnow Test bestätigte die Normalverteilung in der Grundgesamtheit der Stichproben und der Levene Test ergab für alle Daten eine Varianzhomogenität. Folglich konnten zur Untersuchung der Unterschiede parametrische Tests verwendet werden. Für die am finalen Tag der Therapiestudie erhobenen Daten wurden mit dem einseitigen Student's T-Test für unabhängige Stichproben Signifikanzen berechnet. Die Daten, die über den Verlauf der Studie an verschiedenen Zeitpunkten individuell für jede Maus erhoben wurden, sind voneinander statistisch abhängig. Daher wurde der Student's T-Test für gepaarte Stichproben zur Auswertung verwendet. Als statistisch signifikant gilt ein Wert von $p < 0,05$.

Um die biologische Relevanz der Daten und ihrer statistisch signifikanten Mittelwertunterschiede auf standardisierte Weise darzustellen, wurde die Effektgröße g nach Cohen, modifiziert nach Hedges nach der in Abbildung 10 dargestellten Formel berechnet⁶³. Die Effektgröße dient dazu, das Ausmaß der Wirkung einer Variable zu messen. Sie ist unabhängig von der Stichprobengröße und von dem Ergebnis der statistischen Analyse. Nach Cohen gilt ein Wert von $d=0,2$ als kleiner, von $d=0,5$ als mittlerer und $d=0,8$ als großer Effekt.

$$g = \frac{|x_1| - |x_2|}{\frac{\sqrt{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}}{n_1 + n_2 - 2}}$$

ABBILDUNG 10: Formel nach Cohen, modifiziert nach Hedges. Formel zur Berechnung der Effektgröße g . x ist der Mittelwert aus der jeweiligen Stichprobe s , n ist die Gruppengröße.

IV. ERGEBNISSE

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der Vorversuche und der Therapiestudie in der Reihenfolge MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 präsentiert. Eine detaillierte Auflistung der Zahlenwerte findet sich im Anhang (siehe IX).

1. Ergebnisse der Vorversuche zur Findung der Applikationsart und Dosis

Vor Beginn der Therapiestudie wurden MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 hinsichtlich ihrer dosisabhängigen Wirkung auf Volumen und Osmolalität des Urins untersucht. 10 CD1^{pcy/pcy} Mäuse bekamen die verschiedenen Substanzen intraperitoneal oder subkutan appliziert. Die CD1^{pcy/pcy} Maus eignet sich für diese Studie, da sie aufgrund einer Mutation im Gen *NPHP3* eine langsam progressive Form der ARPKD entwickelt, die in ihrer Ausprägung mit der humanen ADPKD vergleichbar ist (vergleiche III.1).

MCF-264 löst über seine agonistische Bindung an den V2-Rezeptor wie nach Bindung von Vasopressin selbst die intrazelluläre Signalkaskade aus. Diese resultiert über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in einem vermehrten Einbau von Aquaporin-2 und im Weiteren in einer vermehrten Resorption von Wasser aus dem Harn. Dadurch bedingt eine Behandlung mit MCF-264 eine Antidiurese mit Ausscheidung geringerer Mengen an Urin. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde MCF-264 in einer Dosierung von 10 µmol/kg und von 20 µmol/kg intraperitoneal und subkutan getestet.

Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 wurde den Mäusen angelehnt an die Literatur^{26, 64} zunächst in einer Dosis von 1 µmol/kg als intraperitoneale oder subkutane Injektion appliziert. Nachdem OPC-31260 in dieser Dosierung keine Veränderungen des Urinvolumens und der Urinosmolalität bewirkte, wurde zusätzlich eine Dosis von 10 µmol/kg getestet.

Mambaquaretin-1 zeigte in der Zellkultur eine sehr hohe Affinität für den V2-Rezeptor und blockierte ihn auch nach Zugabe von Vasopressin vollständig (Nicolas Gilles, CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich, unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Mambaquaretin-1 *in vivo* zu einer Diurese führt. Nachdem eine Dosis von 1 µmol/kg als intraperitoneale und als subkutane Injektion diese Hypothese bestätigte, wurden die geringeren Dosierungen von 0,1 µmol/kg und 0,01 µmol/kg über den intraperitonealen Applikationsweg untersucht.

Im Folgenden sind die Ergebnisse präsentiert. Grundsätzlich ist anzumerken, dass weder für MCF-264 noch für OPC-31260 oder für Mambaquaretin-1 ein signifikanter Unterschied zwischen der intraperitonealen und subkutanen Applikationsart festgestellt werden konnte.

1.1. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 zeigte *in vivo* keinen antidiuretischen Effekt

Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 führte 24 Stunden nach der ersten intraperitonealen Injektion sowohl in einer Dosis von 10 $\mu\text{mol/kg}$ als auch in einer Dosis von 20 $\mu\text{mol/kg}$ zu einer Reduktion des Urinvolumens. Anschließend (drei und fünf Tage nach der ersten Injektion) schieden die Mäuse wieder vermehrt Urin aus, erreichten den Ausgangswert aber nicht mehr. MCF-264 reduzierte das Urinvolumen in einer Dosis von 10 $\mu\text{mol/kg}$ insgesamt um die Hälfte und in einer Dosis von 20 $\mu\text{mol/kg}$ insgesamt um 31 % im Vergleich zu dem Basiswert. Die subkutane Applikationsart zeigte im Bezug auf das Urinvolumen keine Tendenz. Eine Dosis von 10 $\mu\text{mol/kg}$ reduzierte zunächst das Urinvolumen, es stieg dann aber wieder an, insgesamt um 39 % im Vergleich zu dem Basiswert. In einer Dosis von 20 $\mu\text{mol/kg}$ führte MCF-264 zunächst zu einem zweifachen Anstieg des Urinvolumens, das aber im Versuchsverlauf wieder abfiel (Abbildung 11). Die im gewonnenen Urin gemessene Osmolalität (Abbildung 12) veränderte sich unter dem Einfluss von MCF-264 nicht. Sie bewegte sich in einem Bereich von $1119,4 \pm 238,1$ mosmol/kg und $1348,6 \pm 333,7$ mosmol/kg (MW \pm SD).

Urinvolumen und Urinosmolalität erhöhten oder verringerten sich nach Gabe von MCF-264 ohne einheitliches Muster. Daher konnten diese Veränderungen nicht eindeutig als antidiuretischer Effekt von MCF-264 interpretiert werden.

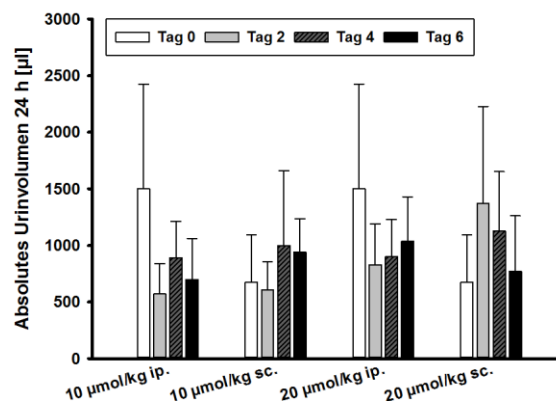


ABBILDUNG 11: Tägliche Urinproduktion nach Behandlung mit MCF-264 in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung. Zu sehen sind die MW \pm SD der Urinvolumina zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach täglicher intraperitonealer oder subkutaner Injektion von MCF-264 in einer Dosierung von je 10 $\mu\text{mol/kg}$ und 20 $\mu\text{mol/kg}$ (n=5).

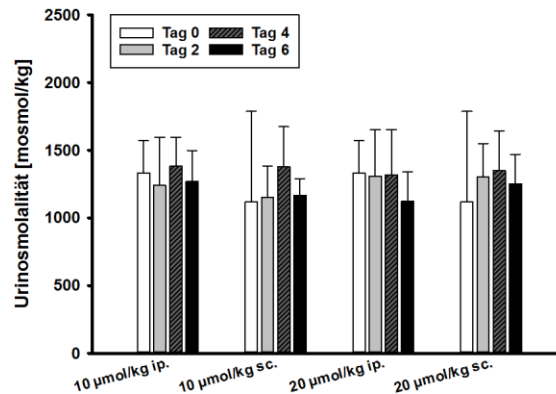


ABBILDUNG 12: Urinosmolalität nach Behandlung mit MCF-264 in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung. Zu sehen sind die MW \pm SD der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Urinosmolalität nach täglicher intraperitonealer oder subkutaner Injektion von MCF-264 in einer Dosierung von je 10 μ mol/kg und 20 μ mol/kg (n=5).

1.2. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 bewirkte in der CD1^{pcy/pcy} Maus keine Diurese

OPC-31260 führte unabhängig von Dosierung und Applikationsart 24 Stunden nach der ersten Injektion zu einer Reduktion des Urinvolumens um 18 % bis 58 % im Vergleich zu dem Basiswert in Korrelation mit einer Steigerung der Urinosmolalität. Im weiteren Versuchsverlauf stieg das Urinvolumen wieder an und die Urinosmolalität sank ab. Nach Behandlung mit OPC-31260 in einer Dosierung von 10 μ mol/kg als intraperitoneale Injektion konnte ein maximales Urinvolumen von 1335 μ l gemessen werden (vergleiche Mambaquaretin-1: maximal gemessenes Urinvolumen von 4500 μ l bei einer Dosierung von 1 μ mol/kg). Die Daten sind in Abbildung 13 und Abbildung 14 präsentiert.

Da sich eine Diurese durch eine Erhöhung des Urinvolumens mit gleichzeitiger Verminderung der Urinosmolalität auszeichnet, konnten die im Rahmen der Vorversuche gewonnenen Ergebnisse nicht als diuretischer Effekt von OPC-31260 interpretiert werden.

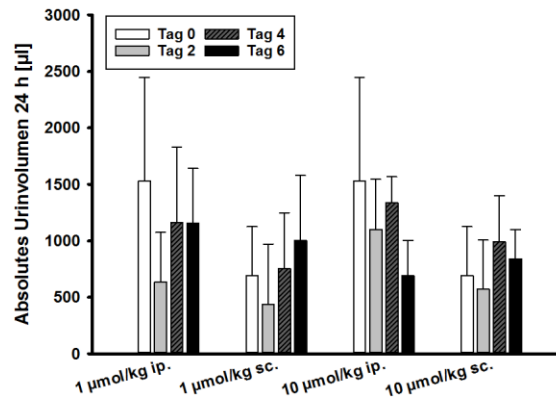


ABBILDUNG 13: Tägliche Urinproduktion nach Behandlung mit OPC-31260 in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung. Zu sehen sind die MW \pm SD der Urinvolumina zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach täglicher intraperitonealer oder subkutaner Injektion von OPC-31260 in einer Dosierung von je 1 $\mu\text{mol/kg}$ und 10 $\mu\text{mol/kg}$ ($n=5$).

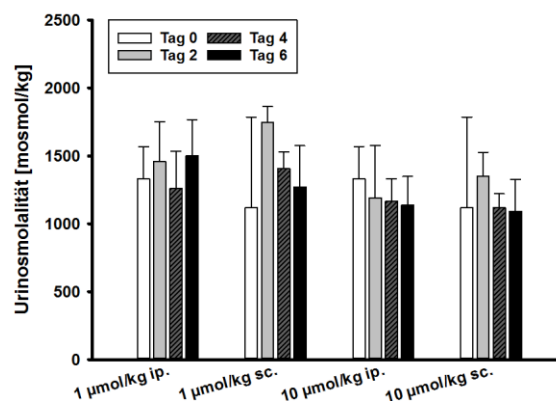


ABBILDUNG 14: Urinosmolalität nach Behandlung mit OPC-31260 in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung. Zu sehen sind die MW \pm SD der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Urinosmolalität nach täglicher intraperitonealer oder subkutaner Injektion von OPC-31260 in einer Dosierung von je 1 $\mu\text{mol/kg}$ und 10 $\mu\text{mol/kg}$ ($n=5$).

1.3. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 zeigte sowohl in einem Mausmodell der PKD als auch in einem Wildtyp-Modell einen diuretischen Effekt

In einer Dosierung von 1 $\mu\text{mol/kg}$ führte Mambaquaretin-1 bereits nach der ersten Injektion zu einem 2,3-fachen Anstieg des Urinvolumens. Eine zweite Injektion verstärkte die Diurese und erhöhte das Urinvolumen auf das 2,8-Fache im Vergleich zu dem Basiswert vor der ersten Injektion. Auch eine Dosierung von 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ führte nach Applikation von Mambaquaretin-1 zu einem Anstieg des Urinvolumens um 60 %. Im weiteren Versuchsverlauf stieg es zunehmend an bis nach der dritten Injektion ein zweifach erhöhtes Urinvolumen gegenüber dem Basiswert gemessen werden konnte.

Mambaquaretin-1 zeigte auch in einer vergleichsweise niedrigen Dosierung von 0,01 $\mu\text{mol/kg}$ einen diuretischen Effekt, allerdings erst nach mehrmaliger intraperitonealer Applikation und weniger deutlich ausgeprägt als in den höheren Dosierungen (Abbildung 15 und Abbildung 16). Gleichzeitig mit der Erhöhung des Urinvolumens konnte eine verminderte Urinosmolalität gemessen werden. In einer Dosierung von 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ und von 1 $\mu\text{mol/kg}$ reduzierte Mambaquaretin-1 bereits nach der ersten intraperitonealen Injektion die Osmolalität im Urin der Mäuse deutlich. Auch eine Dosis von 0,01 $\mu\text{mol/kg}$ reichte aus, um die Osmolalität um 40 % im Vergleich zu dem Basiswert zu senken (Abbildung 18 und Abbildung 19).

Um sicher zu stellen, dass der diuretische Effekt nicht im Zusammenhang mit den zystisch veränderten Nieren der Mäuse steht, wurde Mambaquaretin-1 in einem Wildtypmodell (C57BL/6 Maus) in einer Dosierung von 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ intraperitoneal getestet. Auch hier konnte ein Anstieg des Urinvolumens (Abbildung 17) in Korrelation mit einer Verminderung der Urinosmolalität (Abbildung 20) nachvollzogen werden.

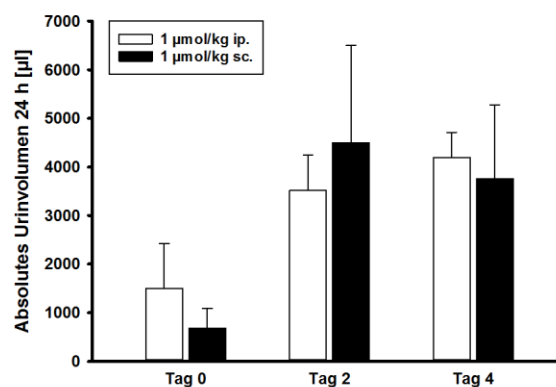


ABBILDUNG 15: Mambaquaretin-1 zeigte keinen Unterschied in Abhängigkeit von der Applikationsart im diuretischen Effekt auf die tägliche Urinproduktion. Zu sehen sind die $\text{MW} \pm \text{SD}$ der Urinvolumina zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach täglicher intraperitonealer oder subkutaner Injektion von Mambaquaretin-1 in einer Dosierung von 1 $\mu\text{mol/kg}$ ($n=5$). Aus Platzgründen sind die Signifikanzen außerhalb des Diagramms in Tabelle 7 dargestellt.

TABELLE 7: Signifikanzen für das Urinvolumen nach sc-Applikation von Mambaquaretin-1.

Ns.: nicht signifikant, *: signifikant mit $p < 0,05$, **: signifikant mit $p < 0,01$.

Mambaquaretin-1 sc., Urinvolumen			
1 $\mu\text{mol/kg}$	Tag 0	Tag 2	Tag 4
Tag 0		**	*
Tag 2			ns.

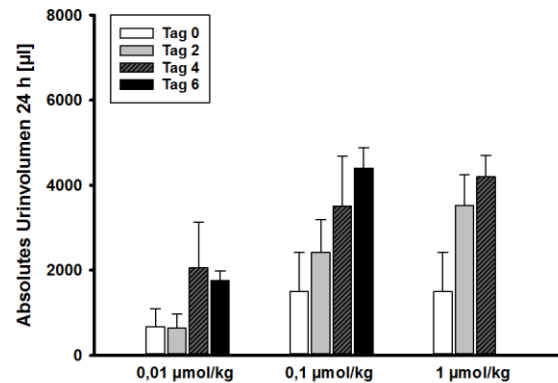


ABBILDUNG 16: Diuretischer Effekt von Mambaquaretin-1 auf die tägliche Urinproduktion in Abhängigkeit von der Dosierung. Zu sehen sind die MW \pm SD der Urinvolumina zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach täglicher intraperitonealer Injektion von Mambaquaretin-1 in aufsteigender Dosierung (n=5). Aus Platzgründen sind die Signifikanzen außerhalb des Diagramms in Tabelle 8 dargestellt.

TABELLE 8: Signifikanzen für das Urinvolumen nach ip-Applikation von Mambaquaretin-1.

Ns.: nicht signifikant, *: signifikant mit $p < 0,05$, **: signifikant mit $p < 0,01$.

Mambaquaretin-1 ip, Urinvolumen				
0,01 µmol/ kg	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Tag 0		ns.	ns.	*
Tag 2			*	**
Tag 4				ns.
0,1 µmol/ kg	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Tag 0		ns.	ns.	**
Tag 2			ns.	**
Tag 4				ns.
1 µmol/ kg	Tag 0	Tag 2	Tag 4	
Tag 0		*	**	
Tag 2			ns.	

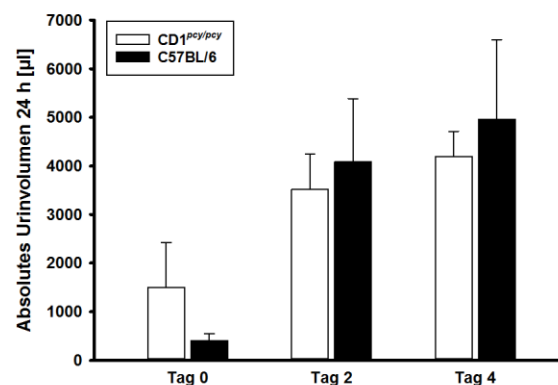


ABBILDUNG 17: Mambaquaretin-1 zeigte in Abhängigkeit vom Mausstamm keinen Unterschied im diuretischen Effekt auf die tägliche Urinproduktion. Vergleichend dargestellt sind die MW \pm SD der Urinvolumina von CD1^{pcy/pcy} Mäusen (n=5) mit C57BL/6 Mäusen (n=10) nach täglicher intraperitonealer Injektion von Mambaquaretin-1 in einer Dosierung von 0,1 µmol/kg.

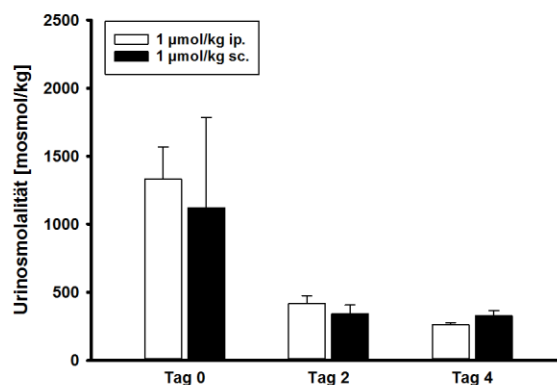


ABBILDUNG 18: Mambaquaretin-1 zeigte in Abhängigkeit von der Applikationsart keinen Unterschied in seiner Wirkung auf die Urinosmolalität. Zu sehen ist die gemessene Urinosmolalität nach täglicher intraperitonealer oder subkutaner Injektion von Mambaquaretin-1 in einer Dosierung von 1 µmol/kg.

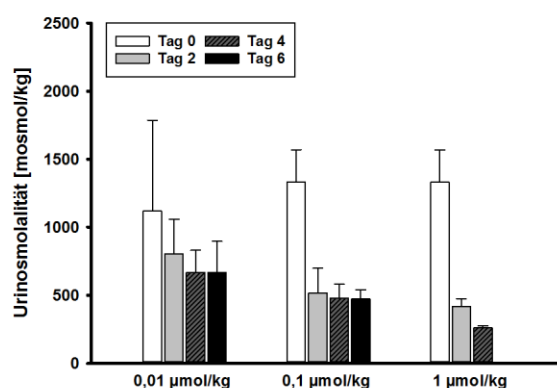


ABBILDUNG 19: Effekt von Mambaquaretin-1 auf die Urinosmolalität in Abhängigkeit von der Dosierung. Zu sehen ist die Urinosmolalität nach täglicher intraperitonealer Injektion von Mambaquaretin-1 in aufsteigender Dosierung. Aus Platzgründen sind die Signifikanzen außerhalb des Diagramms in Tabelle 9 dargestellt.

TABELLE 9: Mambaquaretin-1, Signifikanzen für die Osmolalität nach ip-Applikation.

Ns.: nicht signifikant, *: signifikant mit $p < 0,05$, **: signifikant mit $p < 0,01$.

Mambaquaretin-1 ip, Urinosmolalität				
0,01 µmol/ kg	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Tag 0		ns.	ns.	ns.
Tag 2			ns.	ns.
Tag 4				ns.
0,1 µmol/ kg	Tag 0	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Tag 0		*	**	**
Tag 2			ns.	ns.
Tag 4				ns.
1 µmol/ kg	Tag 0	Tag 2	Tag 4	
Tag 0		**	**	
Tag 2			**	

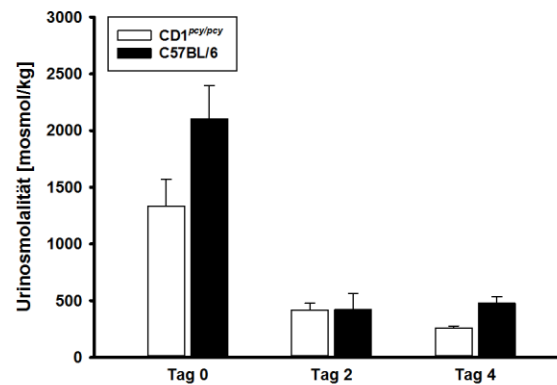


ABBILDUNG 20: Mambaquaretin-1 zeigte in Abhängigkeit vom Mausstamm keinen Unterschied in seiner Wirkung auf die Urinosmolalität. Vergleichend dargestellt ist die Urinosmolalität von CD1^{pcy/pcy} Mäusen (n=5) mit C57BL/6 Mäusen (n=10) zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach täglicher intraperitonealer Injektion von Mambaquaretin-1 in einer Dosierung von 0,1 µmol/kg.

1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche

Weder MCF-264 noch OPC-31260 führten trotz der Verwendung hoher Dosierungen zu statistisch signifikanten Veränderungen des Urinvolumens und der Urinosmolalität. Eine Behandlung mit Mambaquaretin-1 dagegen bewirkte selbst bei einer vergleichsweise niedrigen Dosierung von 0,01 µmol/kg eine messbare Erhöhung des Urinvolumens in Korrelation mit einer Erniedrigung der Urinosmolalität.

Da zwischen der intraperitonealen und der subkutanen Applikationsart weder für MCF-264 noch für OPC-31260 oder für Mambaquaretin-1 ein signifikanter Unterschied gesehen wurde und die intraperitoneale Injektion einfacher in der Handhabung ist, wurde die intraperitoneale Applikationsart für die Therapiestudie gewählt. Weder MCF-264 noch OPC-31260 führten während der Vorversuche zu messbaren Veränderungen des Volumens oder der Osmolalität des Urins. Hingegen zeigte Mambaquaretin-1 einen diuretischen Effekt (Abbildung 16 und Abbildung 19), so dass die Ergebnisse für Mambaquaretin-1 zur Festsetzung der Dosis für die Therapiestudie dienten. Um die Lebensqualität der Versuchstiere über die Studiendauer von 100 Tagen nicht durch eine zu starke Polyurie und die daraus resultierende Dehydratation einzuschränken, wurde für die Therapiestudie eine Dosierung von 0,1 µmol/kg gewählt, da in dieser Dosierung der diuretische Effekt von Mambaquaretin-1 nicht maximal ausgeprägt aber noch deutlich sichtbar war. Im Rahmen dieser Studie sollten die Auswirkungen der Stimulation und Blockade des V2-Rezeptors auf die Morphologie und Funktion der Niere untersucht werden, so dass MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 unabhängig von ihrer Wirkung auf Urinvolumen und Urinosmolalität in die Therapiestudie aufgenommen wurden.

2. Ergebnisse im Verlauf der Therapiestudie

Im Verlauf der Therapiestudie wurden Daten zu folgenden Parametern erhoben:

- *Körpergewicht*

Um den Gesundheitszustand der Mäuse zu überwachen, wurde neben der subjektiven Einschätzung des Allgemeinbefindens durch tägliche Adspektion der Tiere, das Körpergewicht als objektiver Parameter über die Dauer der Therapiestudie an Tag 0 | 30 | 70 | 100 (für MCF-264 Tag 0 | 30 | 70 | 86) gemessen.

- *Urinuntersuchung*

An Tag 0 | 30 | 70 | 100 (für MCF-264 Tag 0 | 30 | 86) wurden 24 Stunden Sammelurinproben gewonnen. Der Urin diente der Überwachung der folgenden im Detail beschriebenen Parameter.

- *Messung des absoluten und Berechnung des relativen Volumens*

Wie aus den Ergebnissen der Vorversuche hervorging, ist nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 eine Diurese zu erwarten. Ferner führt die PKD in ihrem Verlauf zu einer Einschränkung der Nierenfunktion, so dass mit Abweichungen des Urinvolumens vom physiologischen Zustand über den Studienzeitraum zu rechnen ist. Zur Überwachung dieser Veränderungen wurden die absoluten Volumina der Sammelurinproben mit Hilfe einer Pipette gemessen. Um zu verhindern, dass Unterschiede in der Urinmenge, die durch die Individualität der Mäuse bedingt sind, falsch als Gruppenunterschiede interpretiert werden, wurde zusätzlich das relative Urinvolumen bezogen auf das Körpergewicht berechnet.

- *Messung der Osmolalität und der Elektrolytkonzentration*

Bisherige Studien zeigten für OPC-31260, dass die Blockade des V2-Rezeptors nicht zu einem Verlust von Elektrolyten führt^{26, 56}. Die Ergebnisse der vorangegangenen Vorversuche (vergleiche IV.1.3) führten zu der Hypothese, dass die durch Mambaquaretin-1 ausgelöste Diurese aus einer vermehrten Ausscheidung von Wasser ohne Elektrolytverlust resultiert. Zur Klärung dieser Hypothese wurden in den während der Therapiestudie gewonnenen Urinproben sowohl die Urinosmolalität als auch die Konzentrationen von Natrium, Kalium und Ammonium (summiert als Kationen dargestellt), sowie von Chlorid, Phosphat und Sulfat (summiert als Anionen dargestellt) bestimmt.

- *Analyse der Harnstoff- und Kreatininkonzentration*

Harnstoff und Kreatinin sind Laborwerte, die standardmäßig sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin der Überwachung der Nierenfunktion dienen. Harnstoff ist das harnpflichtige Endprodukt aus dem Proteinstoffwechsel im Körper. Beim Abbau der Proteine fällt zellschädigendes Ammoniak an. Dieses wird in der Leber zu Harnstoff umgebaut und über die Niere ausgeschieden. Sowohl eine vermehrte Proteinaufnahme über die Nahrung als auch eine eingeschränkte Nierenfunktion können zu einem Anstieg der Harnstoffkonzentration im Blut führen.

Kreatinin ist das harnpflichtige Endprodukt des endogenen Muskelstoffwechsels. Es wird von der gesunden Niere in relativ konstanter Menge unabhängig von der aufgenommenen Nahrung vor allem glomerulär gefiltert und nicht rückresorbiert. Durch Messung der Kreatininkonzentration im Urin und im Blutplasma kann die Funktionsfähigkeit der Niere und der Zustand des glomerulären Filters eingeschätzt werden.

- *Analyse des Gesamtproteins*

Die Plasmaproteine werden im glomerulären Filter je nach Größe und Ladung zurückgehalten oder durchgelassen. In der gesunden Niere werden Proteine, die größer als 70 kDa sind, zurückgehalten und kleinere Proteine, die den glomerulären Filter passieren, werden größtenteils im proximalen Tubulus resorbiert. Eine Schädigung des glomerulären Filters oder eine gestörte Funktion der Tubulusepithelzellen können zu einer vermehrten Ausscheidung von Protein im Urin führen, so dass über die Messung der ausgeschiedenen Proteinmenge eine Einschätzung des Zustands des glomerulären Filters im Verlauf der PKD unbehandelter und behandelter Versuchstiere möglich ist.

2.1. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Abweichungen des Körpergewichts und der beschriebenen Urinparameter

Grundsätzlich ist zu beachten, dass der Versuch für die Mäuse der Verumgruppe MCF-264 aufgrund eines reduzierten Allgemeinbefindens bereits an Tag 86 in einem Alter von 22 Wochen beendet wurde. Für die Kontrollgruppe war das Versuchsende an Tag 100 (24 Wochen alt). Das Körpergewicht der Verumgruppe MCF-264 zeigte zu Beginn der Therapiestudie (Tag 0) keinen Unterschied zu der Kontrollgruppe. Die Mäuse der Verumgruppe MCF-264 nahmen insgesamt bis Tag 86 um 5 % an Gewicht zu. Sie waren über den gesamten Studienzeitraum mäßig schwerer als die Mäuse der Kontrollgruppe, was an Tag 30 zu einem signifikanten Unterschied von 7 % führte (23,0 g vs. 21,5 g, $p=0,026$, $g=|1,33|$). Von Tag 0 auf Tag 30 konnte sowohl für die Mäuse der Verumgruppe (14 % \uparrow) als auch für die Mäuse der Kontrollgruppe (6 % \uparrow) die größte Gewichtszunahme gemessen werden. Sie ist für beide Gruppen signifikant (Verumgruppe: $p<0,001$, $g=|2,11|$, Kontrollgruppe: $p=0,035$, $g=|1,32|$). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass eine Behandlung mit MCF-264 das Wachstum und die physiologische Entwicklung der Mäuse nicht einschränkt (Abbildung 21).

Wie bereits die Ergebnisse der Vorversuche zeigten (Abbildung 11), bewirkte MCF-264 über den gesamten Studienzeitraum keine Antidiurese. Bis zum Ende der Therapiestudie an Tag 86 stiegen das absolute und das relative Urinvolumen geringfügig an, während die Urinosmolalität stetig abfiel (Abbildung 22 bis Abbildung 24). Dementsprechend nahmen auch die Kationen- und Anionenkonzentration sowie die Harnstoff- und Proteinkonzentration stetig ab. Die Kreatininkonzentration war an Tag 30 erhöht, verringerte sich aber bis zum Ende der Therapiestudie (Abbildung 25 bis Abbildung 29). Die Kontrollgruppe wies für alle untersuchten Parameter vergleichbare Werte auf.

Es ist davon auszugehen, dass die beobachteten Veränderungen keine Abweichungen von dem physiologischen Zustand der Versuchstiere darstellten und in keinem Zusammenhang zu der Behandlung mit MCF-264 zu sehen sind.

Die Analyse von Harnstoff und Kreatinin im Blutplasma ergab signifikante Abweichungen von der Kontrollgruppe (Abbildung 30 und Abbildung 31). Die Harnstoffkonzentration im Blutplasma der Verumgruppe MCF-264 war um 32 % gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p=0,021$, $g=|1,33|$). Dagegen war die Kreatininkonzentration um 50 % erniedrigt ($p=0,032$, $g=|1,23|$).

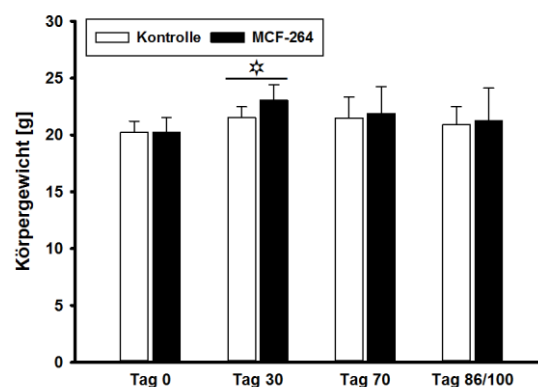


ABBILDUNG 21: Physiologische Entwicklung des Körpergewichts der Verumgruppe MCF-264 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 ($n=6$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($n=7$). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe. *: $p<0,05$.

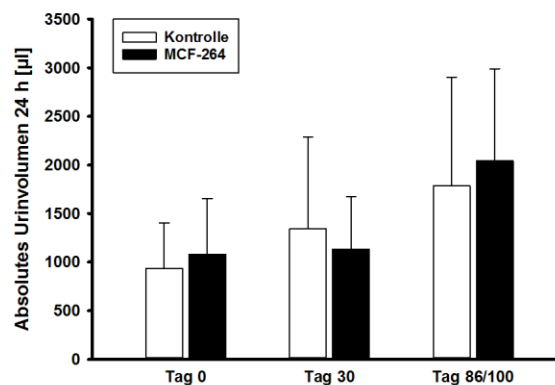


ABBILDUNG 22: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die tägliche Urinproduktion über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 ($n=6$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($n=7$). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe.

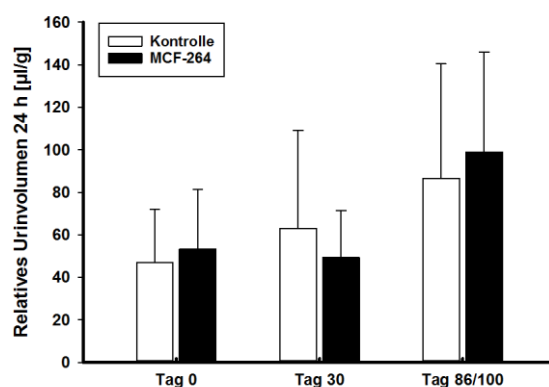


ABBILDUNG 23: Entwicklung des Urinvolumens in 24 Stunden nach Bezug auf das Körpergewicht über den Studienzeitraum. Darstellung der $\text{MW} \pm \text{SD}$ der Verumgruppe MCF-264 ($n=6$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($n=7$). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe.

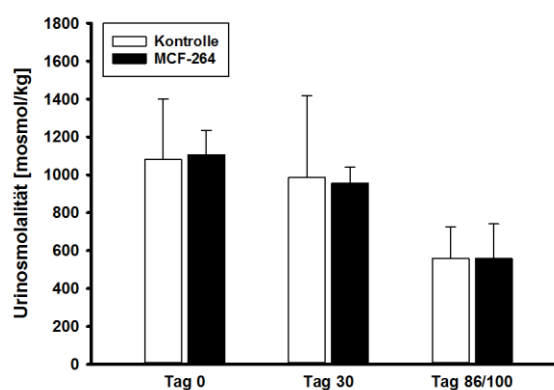


ABBILDUNG 24: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Urinosmolalität über den Studienzeitraum. Darstellung der $\text{MW} \pm \text{SD}$ der Verumgruppe MCF-264 ($n=6$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($n=7$). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe.

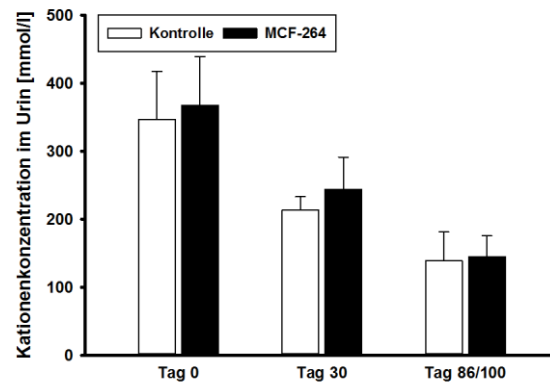


ABBILDUNG 25: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Kationenkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe.

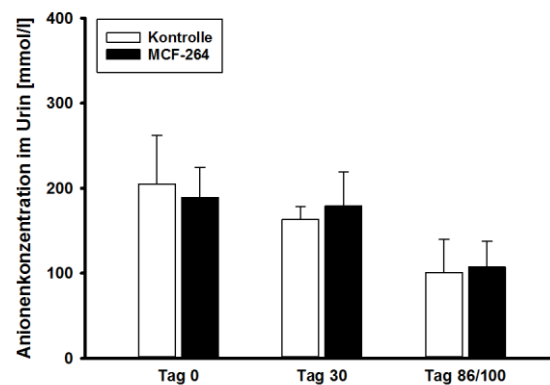


ABBILDUNG 26: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Anionenkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe.

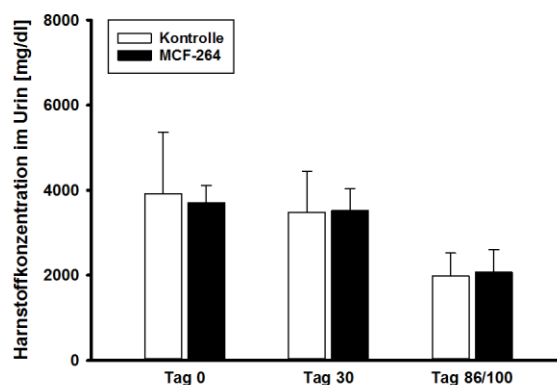


ABBILDUNG 27: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Harnstoffkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe.

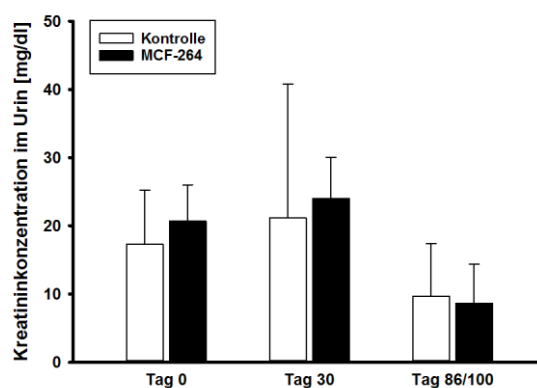


ABBILDUNG 28: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Kreatininkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe.

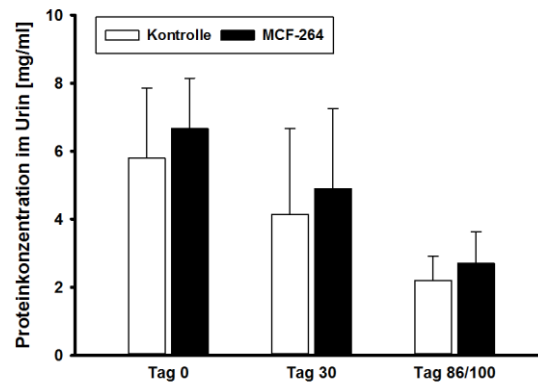


ABBILDUNG 29: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Proteinkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Letzter Messzeitpunkt: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe.

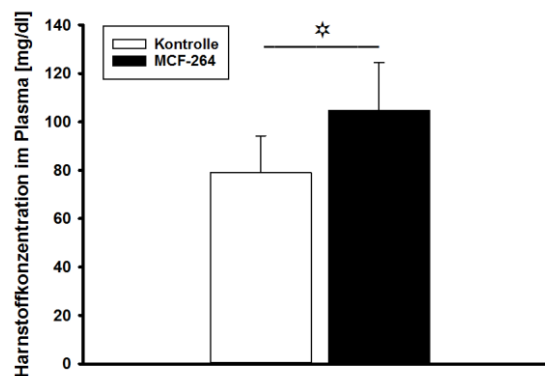


ABBILDUNG 30: MCF-264 führte zu einer erhöhten Harnstoffkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Endzeitpunkt der Therapiestudie: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe. *: $p < 0,05$.

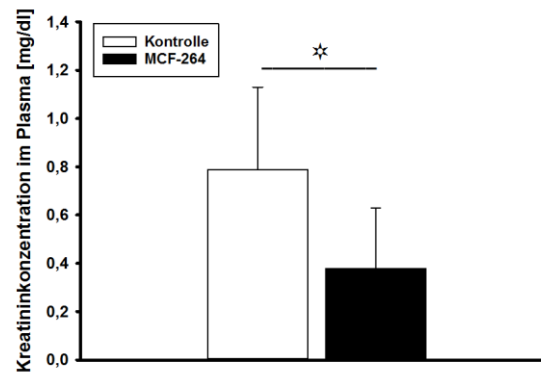


ABBILDUNG 31: MCF-264 führte zu einer Reduktion der Kreatininkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Endzeitpunkt der Therapiestudie: Tag 86 für die Verumgruppe MCF-264 und Tag 100 für die Kontrollgruppe. *: $p < 0,05$.

2.2. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 bewirkte keine Diurese und erhöhte alle beschriebenen Urinparameter gegenüber der Kontrollgruppe

Die Mäuse der Verumgruppe OPC-31260 zeigten zu Beginn (Tag 0) und folglich auch über die Dauer der Therapiestudie ein mäßig gegenüber der Kontrollgruppe reduziertes Körpergewicht. An Tag 0 ($p=0,020$, $g=|1,33|$) und an Tag 30 ($p=0,012$, $g=|1,49|$) war dieser Unterschied signifikant. Dennoch nahmen die Mäuse der Verumgruppe (bis Tag 100 6 % \uparrow , $p=0,012$, $g=|0,96|$) vergleichbar mit der Kontrollgruppe (bis Tag 100 3 % \uparrow) stetig an Gewicht zu (Abbildung 32), so dass die körperliche Entwicklung der behandelten Versuchstiere als physiologisch beurteilt werden kann.

OPC-31260 bewirkte, wie bereits aus den Vorversuchen ersichtlich war, trotz der Blockade des V2-Rezeptors keine Diurese im Verlauf der Therapiestudie. Es konnte zu keinem Messzeitpunkt ein relevanter Anstieg des absoluten oder relativen Urinvolumens gemessen werden und im Vergleich zu der Kontrollgruppe bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 33 und Abbildung 34). Die Konzentrationen von Kationen, Anionen, Harnstoff, Kreatinin und Gesamtprotein im Urin sowie die Urinosmolalität veränderten sich über den Studienzeitraum nicht. Durch die konstante Verminderung dieser Parameter in der Kontrollgruppe konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren für Tag 70 und Tag 100 ermittelt werden. An Tag 70 waren alle Parameter (Osmolalität: $p=0,026$, $g=|1,11|$, Kationen: $p=0,021$, $g=|1,46|$, Anionen: $p=0,022$, $g=|1,42|$, Harnstoff: $p=0,012$, $g=|1,50|$, Kreatinin: $p=0,035$, $g=|1,15|$, Gesamtprotein: $p=0,031$, $g=|1,19|$) gegenüber der Kontrollgruppe zweifach erhöht. An Tag 100 waren die Kationen- ($p=0,021$, $g=|1,46|$) und Anionenkonzentration ($p=0,023$, $g=|1,43|$) 1,5-fach, die Harnstoffkonzentration ($p=0,005$, $g=|1,75|$) und die Osmolalität ($p=0,009$; $g=|1,73|$) zweifach sowie die Kreatinin- ($p=0,038$, $g=|1,12|$) und Proteinkonzentration ($p=0,011$, $g=|1,51|$) 2,5-fach gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 36 bis Abbildung 40).

Die Harnstoffkonzentration (Abbildung 41) im Blutplasma war in der Verumgruppe OPC-31260 im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (60,1 mg/dl vs. 79,1 mg/dl, $p=0,011$, $g=|1,40|$). Die Kreatininkonzentration wich nur in geringem Maße von der Kontrollgruppe ab (Abbildung 42).

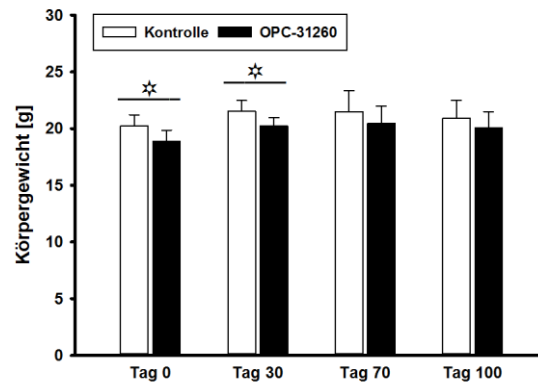


ABBILDUNG 32: Physiologische Entwicklung des Körpergewichts der Verumgruppe OPC-31260 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 ($n=7$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($n=7$). *: $p<0,05$.

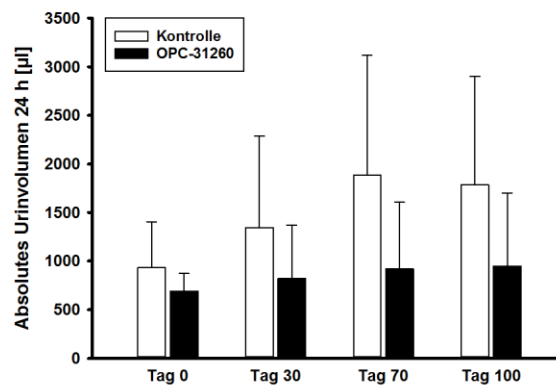


ABBILDUNG 33: OPC-31260 führte zu keinen Veränderungen der täglichen Urinproduktion über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 ($n=7$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($n=7$).

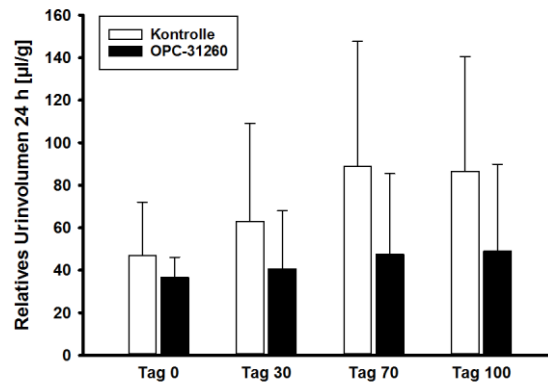


ABBILDUNG 34: Entwicklung des Urinvolumens in 24 Stunden nach Bezug auf das Körpergewicht über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

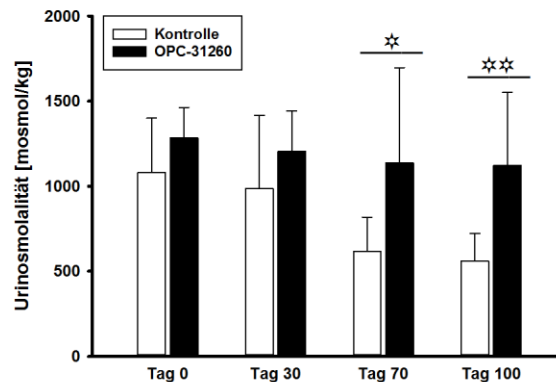


ABBILDUNG 35: OPC-31260 erhöhte die Urinosmolalität über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

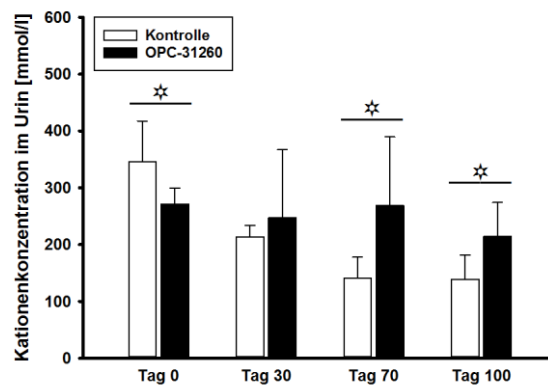


ABBILDUNG 36: OPC-31260 erhöhte die Kationenkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$.

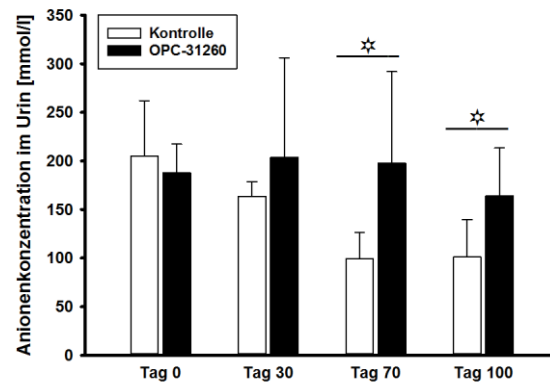


ABBILDUNG 37: OPC-31260 erhöhte die Anionenkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$.

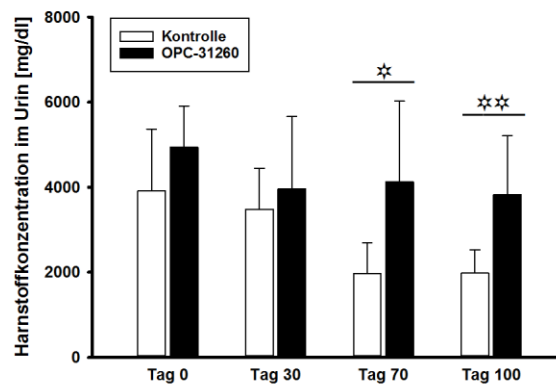


ABBILDUNG 38: OPC-31260 erhöhte die Harnstoffkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

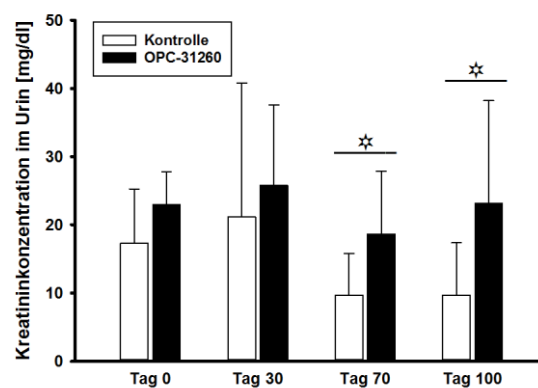


ABBILDUNG 39: OPC-31260 erhöhte die Kreatininkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$.

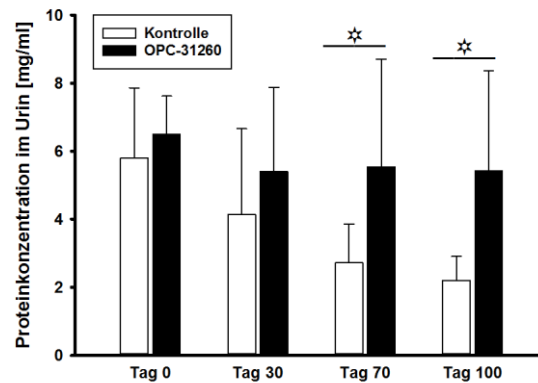


ABBILDUNG 40: OPC-31260 erhöhte die Proteinkonzentration im Urin über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$.

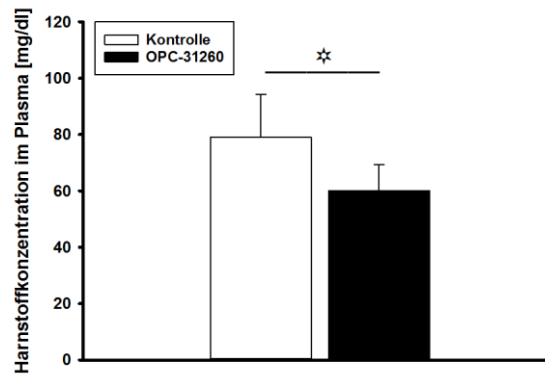


ABBILDUNG 41: OPC-31260 führte zu einer Reduktion der Harnstoffkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$.

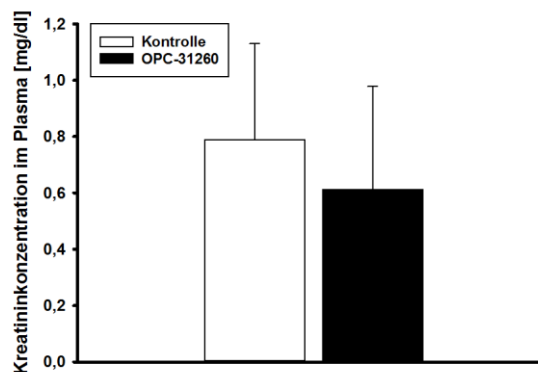


ABBILDUNG 42: OPC-31260 führte zu keinen Veränderungen der Kreatininkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

2.3. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 zeigte über den gesamten Studienzeitraum einen diuretischen Effekt in Korrelation mit einer Reduktion aller gemessenen Parameter im Urin

Das Körpergewicht der Mäuse der Verumgruppe Mambaquaretin-1 zeigte zu keinem Messzeitpunkt eine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe (Abbildung 43). Es konnte sowohl in der Verumgruppe (9 % ↑, $p=0,007$, $g=|0,92|$) als auch in der Kontrollgruppe (14 % ↑, $p=0,002$, $g=|3,16|$) eine signifikante Gewichtszunahme bis Tag 100 beobachtet werden. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die körperliche Entwicklung der Mäuse unter Behandlung mit Mambaquaretin-1 dem physiologischen Zustand entspricht.

Mambaquaretin-1 führte in der CD1^{pcy/pcy} Maus sowohl in den Vorversuchen (Abbildung 16) als auch während der Therapiestudie zu einer Diurese (Abbildung 44 und Abbildung 45). Eine Steigerung des Urinvolumens nach der Applikation von Mambaquaretin-1 war eindeutig zu sehen und die hohe Urinmenge blieb bis zur letzten Messung an Tag 100 erhalten. Das absolute Urinvolumen war über den gesamten Studienzeitraum signifikant um das Zwei- bis Dreifache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Tag 30: $p<0,001$, $g=|3,84|$, Tag 70: $p=0,010$, $g=|1,54|$, Tag 100: $p<0,001$, $g=|3,45|$). Auch nach Bezug des Urinvolumens auf das Körpergewicht der Mäuse blieb dieser Unterschied signifikant (Tag 30: $p<0,001$, $g=|3,54|$, Tag 70: $p=0,014$, $g=|1,45|$, Tag 100: $p<0,001$, $g=|3,30|$). Mambaquaretin-1 führte von Tag 0 bis Tag 100 zu einer Steigerung des absoluten Urinvolumens um das Sechsfache ($p=0,007$, $g=|5,16|$, relatives Urinvolumen fünffach erhöht, $p=0,001$, $g=|4,67|$). Daneben bewirkte eine Behandlung mit Mambaquaretin-1 eine Reduktion sowohl der Urinosmolalität als auch der Elektrolytkonzentration im Urin (Abbildung 46 bis Abbildung 48). Die Urinosmolalität sank von Tag 0 auf Tag 30 um 73 % ($p<0,001$, $g=|8,54|$) und sie war gegenüber der Kontrollgruppe über den gesamten Studienzeitraum von 100 Tagen im Durchschnitt um 60 % signifikant vermindert (Tag 30: $p<0,001$, $g=|4,87|$, Tag 70: $p<0,001$, $g=|2,60|$, Tag 100: $p<0,001$, $g=|3,26|$). Die Elektrolytkonzentration im Urin war nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 an Tag 30 signifikant um 83 % reduziert (Kationen 82 % ↓, $p<0,001$, $g=|9,24|$. Anionen 85 % ↓, $p<0,001$, $g=|8,15|$) und im Vergleich zu der Kontrollgruppe blieb sowohl die Kationen- als auch die Anionenkonzentration nach Tag 0 über die gesamte Studiendauer signifikant erniedrigt. Die Analyse der Harnstoff-, Kreatinin- und Proteinkonzentrationen im Urin nach Applikation von Mambaquaretin-1 ergab zu allen Messzeitpunkten (Tag 30 | 70 | 100) signifikant verminderte Werte in der Verumgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 49 bis Abbildung 51). Sowohl die Harnstoff- als auch die Kreatininkonzentration sanken unter Behandlung mit Mambaquaretin-1 an Tag 30 auf circa ¼ des Ausgangswerts (Harnstoff: 75 % ↓, $p<0,001$, $g=|8,59|$. Kreatinin 68 % ↓, $p<0,001$, $g=|4,39|$) und blieben über den gesamten Studienzeitraum signifikant durchschnittlich um 58 % gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt. Mambaquaretin-1 reduzierte die Proteinkonzentration von Tag 0 auf Tag 30 sogar um 80 % ($p<0,001$, $g=|5,55|$) und sie war im Vergleich zu der Kontrollgruppe über den gesamten Studienzeitraum signifikant um durchschnittlich 70 % vermindert (Tag 30: 81 % ↓, $p=0,002$, $g=|1,98|$, Tag 70: 61 % ↓, $p=0,002$, $g=|2,16|$, Tag 100: 67 % ↓, $p=0,011$, $g=|1,59|$). Für die Kontrollgruppe konnten weder für die Urinosmolalität noch für die Elektrolyt-, Harnstoff-, Kreatinin- und Proteinkonzentrationen im Urin signifikante Veränderungen über den Studienzeitraum gemessen werden.

Auf die Harnstoffkonzentration im Blutplasma übte Mambaquaretin-1 keinen Einfluss aus. Die Kreatininkonzentration im Blutplasma war dagegen signifikant um 68 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe erniedrigt (0,59 mg/dl vs. 1,86 mg/dl, $p=0,002$, $g=[2,13]$, Abbildung 30 und Abbildung 31).

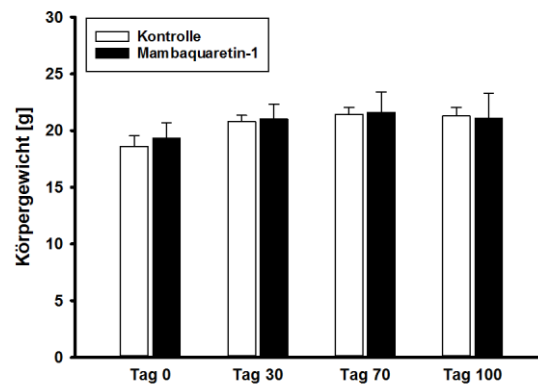


ABBILDUNG 43: Physiologische Entwicklung des Körpergewichts der Verumgruppe Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

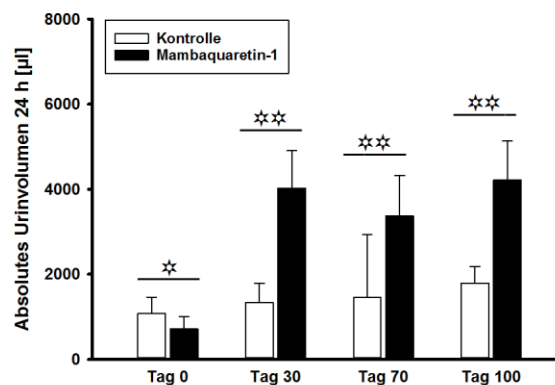


ABBILDUNG 44: Deutlicher diuretischer Effekt von Mambaquaretin-1 auf die tägliche Urinproduktion über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p<0,05$, **: $p<0,01$.

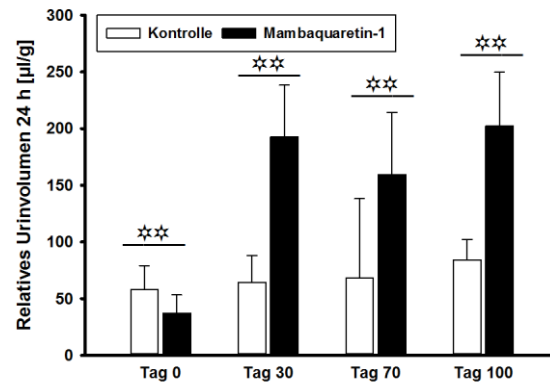


ABBILDUNG 45: Entwicklung des Urinvolumens in 24 Stunden nach Bezug auf das Körpergewicht über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: p<0,01.

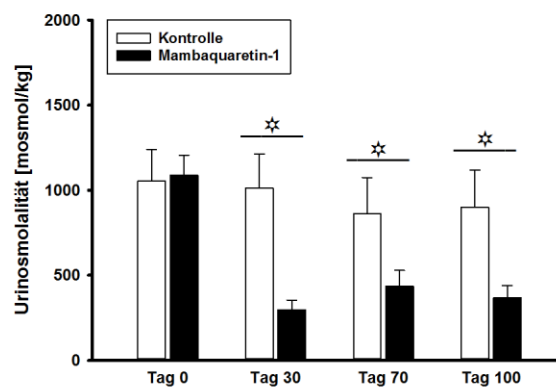


ABBILDUNG 46: Reduktion der Urinosmolalität nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: p<0,05.

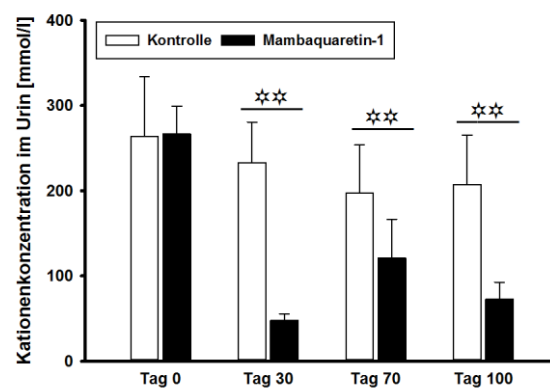


ABBILDUNG 47: Reduktion der Kationenkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: p<0,01.

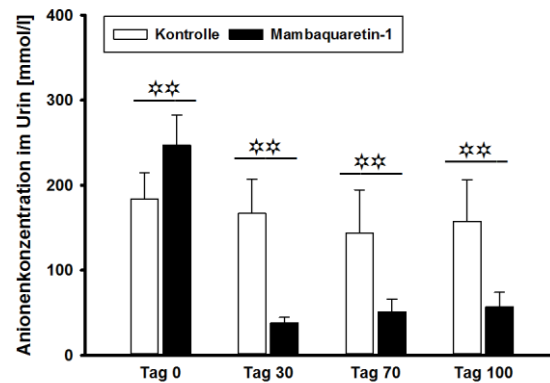


ABBILDUNG 48: Reduktion der Anionenkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: $p < 0,01$.

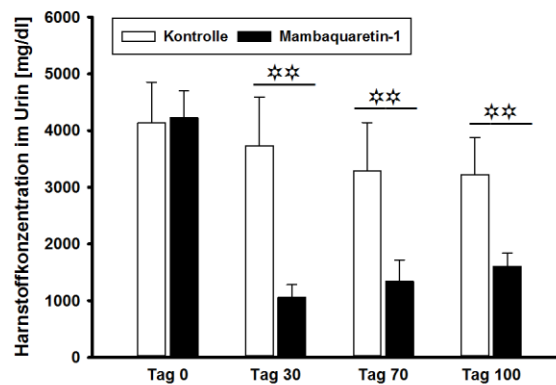


ABBILDUNG 49: Reduktion der Harnstoffkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: $p < 0,01$.

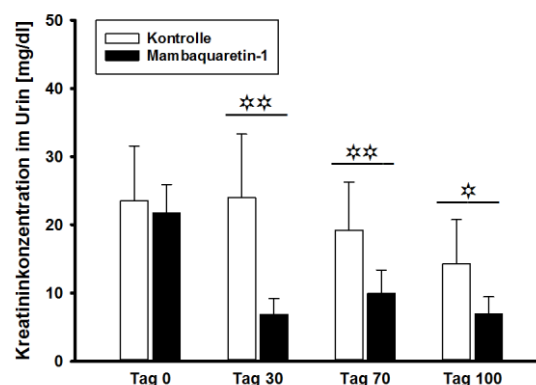


ABBILDUNG 50: Reduktion der Kreatininkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

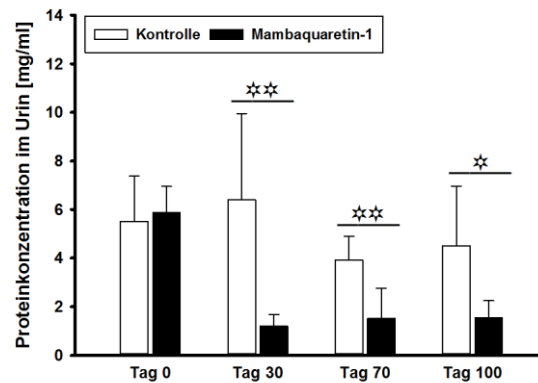


ABBILDUNG 51: Reduktion der Proteinkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

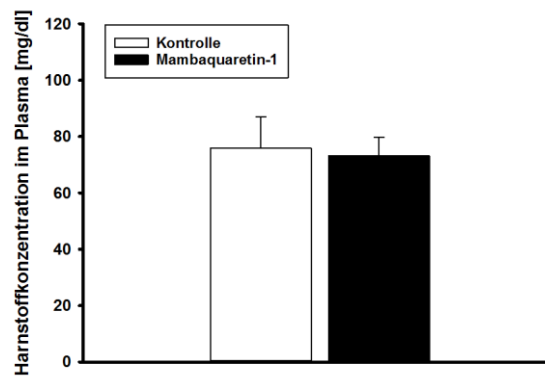


ABBILDUNG 52: Mambaquaretin-1 zeigte keine Wirkung auf die Harnstoffkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

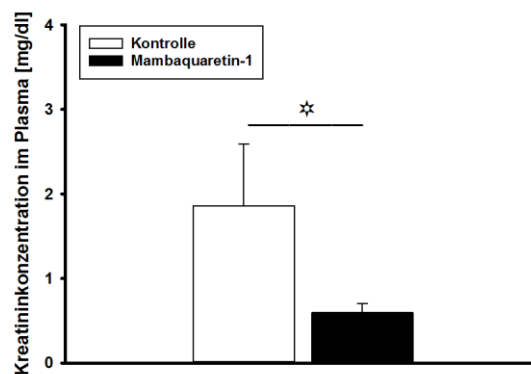


ABBILDUNG 53: Mambaquaretin-1 führte zu einer deutlichen Reduktion der Kreatininkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$.

3. Ergebnisse am Ende der Therapiestudie

Am Ende der Therapiestudie (Tag 100, für MCF-264 Tag 86) wurden nach der Blutentnahme und der Perfusionsfixierung das Herz und beide Nieren entnommen und gewogen. Die Nieren wurden nach ihrer Halbierung in Paraffin eingebettet und die daraus angefertigten histologischen Präparate zur Auswertung der Morphologie HE gefärbt und zur Auswertung der fibrotischen Veränderungen Sirius-Rot gefärbt (vergleiche III.6 und III.7). Die folgenden im Detail beschriebenen Parameter wurden untersucht.

- *Ermittlung des absoluten und relativen Nierengewichts*

Es ist bekannt, dass die polyzystische Nierenerkrankung durch die Zunahme der Zystenanzahl und -größe zu einer massiven Gewichtssteigerung der Nieren führt ⁶⁵. Zur Überprüfung der Veränderungen des Nierengewichts nach Behandlung mit MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 wurden die Nieren nach Entnahme zusammen gewogen. Um zu verhindern, dass Unterschiede im Körpergewicht und somit auch im Nierengewicht der Mäuse falsch als Gruppenunterschiede interpretiert werden, wurde zusätzlich zu dem absoluten Nierengewicht auch das relative Nierengewicht (im Bezug auf das Körpergewicht und im Bezug auf das Herzgewicht) berechnet.

- *Analyse der zystischen Veränderungen*

Im Fokus der Studie stand der Nachweis des protektiven Effekts von Mambaquaretin-1 auf die Nierenarchitektur. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob und in welchem Maße die getesteten Substanzen die Fläche der Zysten, ihre Anzahl und ihre Größe reduzierten. Die Version 2012 der Software Image J ⁶² diente anhand der HE gefärbten histologischen Präparate der Messung der Gesamtfläche der Niere und der Zysten zur Berechnung der relativen Zystenfläche. Darüber hinaus wurden die relative Anzahl der Zysten und ihre durchschnittliche Größe ermittelt. Um die Wertung von Glomerula und kleineren Hohlräumen als Zysten weitestgehend auszuschließen, wurden für die Auswertung nur Hohlräume mit einer Mindestgröße von 0,05 mm² als Zysten definiert (vergleiche III.7.3).

- *Analyse der fibrotischen Veränderungen*

Im Verlauf der PKD führen die progrediente Zystenformation und ihr Wachstum zu einer Druckatrophie der umliegenden Nephrone und des Nierenparenchyms ⁶⁵. Die daraus resultierende massive Einlagerung von Kollagenfasern in das Gewebe führt zu einer sichtbaren Fibrose des Nierenparenchyms. Zur Prüfung in welchem Maße die Nieren fibrotische Veränderungen zeigten und ob die getesteten Substanzen einen Einfluss darauf hatten, wurden die mit Sirius-Rot gefärbten histologischen Präparate mit Hilfe der Version 2012 der Software Image J ausgewertet ⁶².

3.1. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 führte zu einer deutlichen Zunahme des Nierengewichts im Tiermodell

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine mäßig beschleunigte Progression der zystischen Degeneration des Nierenparenchyms nach Behandlung mit MCF-264. Es konnte eine Zunahme des Nierengewichts im Vergleich zu der Kontrollgruppe beobachtet werden. Grundsätzlich ist zu beachten, dass der Versuch für die Mäuse der Verumgruppe MCF-264 aufgrund eines reduzierten Allgemeinbefindens bereits an Tag 86 in einem Alter von 22 Wochen beendet wurde. Für die Kontrollgruppe war das Versuchsende an Tag 100 (24 Wochen alt).

Wie erwartet, zeigten die mit MCF-264 behandelten Mäuse eine signifikante Zunahme des absoluten Nierengewichts beider Nieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe (35 % ↑, $p=0,029$, $g=|1,17|$, Abbildung 54). Dieser Unterschied blieb auch nach Bezug auf das Körpergewicht mit 25 % signifikant ($p=0,028$, $g=|1,19|$, Abbildung 55). Dagegen konnte nur eine mäßige Zunahme der zystischen Veränderungen des Nierenparenchyms beobachtet werden, die keine statistische Signifikanz erreichte. Die relative Zystenfläche beider Nieren war um 13 % vergrößert und die Analyse der relativen Zystenanzahl ergab für beide Nieren eine Zunahme von 4 % gegenüber der Kontrollgruppe. Die mittlere Größe der Zysten war in der rechten Niere der Verumgruppe vergleichbar zu der Kontrollgruppe. In der linken Niere waren die Zysten jedoch signifikant im Mittel signifikant um 33 % größer ($p=0,047$, $g=|1,02|$). Die fibrotischen Veränderungen waren in der Verumgruppe vergleichbar zu der Kontrollgruppe ausgeprägt (Abbildung 57 bis Abbildung 62).

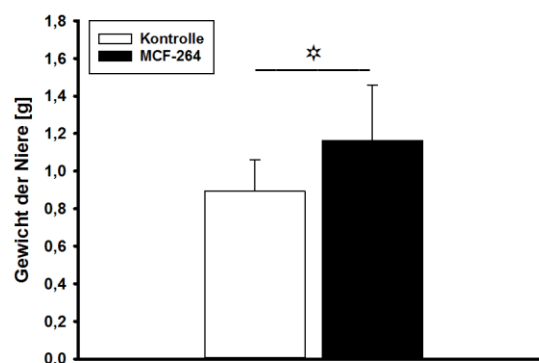


ABBILDUNG 54: Erhöhtes absolutes Nierengewicht nach Behandlung mit MCF-264. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Ende der Therapiestudie für MCF-264 an Tag 86, für die Kontrolle an Tag 100. *: $p<0,05$.

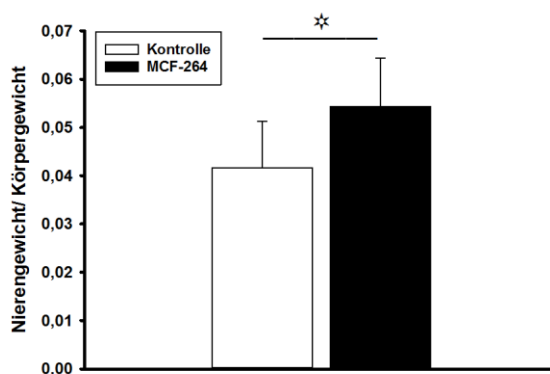


ABBILDUNG 55: Erhöhtes relatives Nierengewicht im Bezug auf das Körpergewicht nach Behandlung mit MCF-264. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Ende der Therapiestudie für MCF-264 an Tag 86, für die Kontrolle an Tag 100. *: $p < 0,05$.

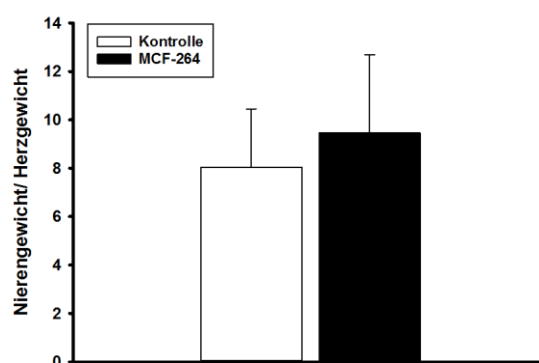


ABBILDUNG 56: Relatives Nierengewicht im Bezug auf das Herzgewicht nach Behandlung mit MCF-264. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Ende der Therapiestudie für MCF-264 an Tag 86, für die Kontrolle an Tag 100.

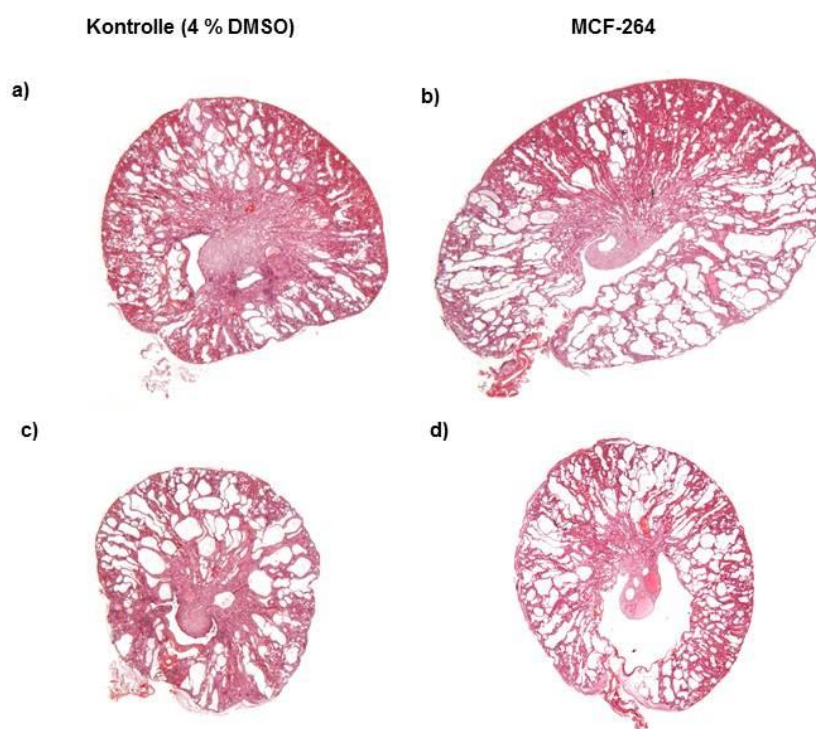


ABBILDUNG 57: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der zystischen Degeneration nach Behandlung mit MCF-264, HE gefärbt. Zu sehen sind unter a) linke Niere der Kontrolle, b) MCF-264 linke Niere, c) rechte Niere der Kontrolle und d) MCF-264 rechte Niere.

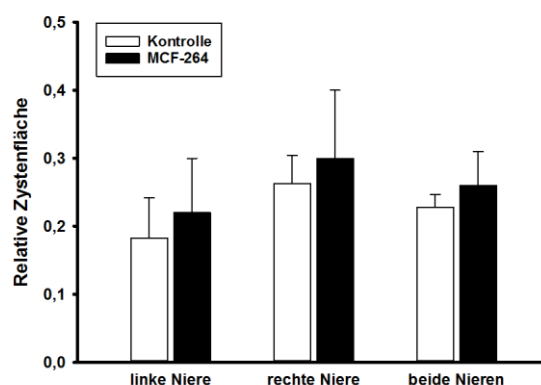


ABBILDUNG 58: Relative Zystenfläche nach Behandlung mit MCF-264. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Ende der Therapiestudie für MCF-264 an Tag 86, für die Kontrolle an Tag 100.

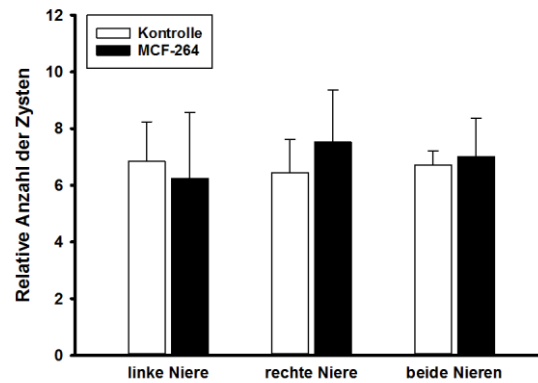


ABBILDUNG 59: Unveränderte relative Anzahl der Zysten nach Behandlung mit MCF-264. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Ende der Therapiestudie für MCF-264 an Tag 86, für die Kontrolle an Tag 100.

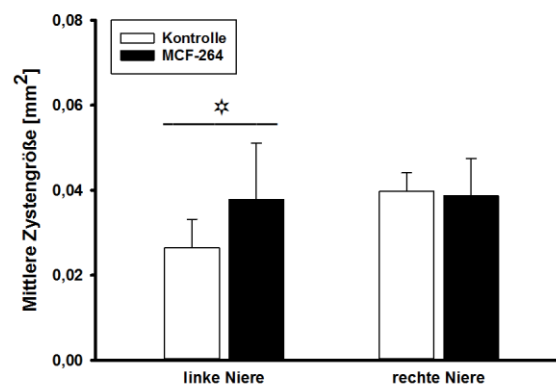


ABBILDUNG 60: Nach Behandlung mit MCF-264 zeigten sich im Mittel vergrößerte Zysten in der linken Niere. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Ende der Therapiestudie für MCF-264 an Tag 86, für die Kontrolle an Tag 100.

*: $p < 0,05$.

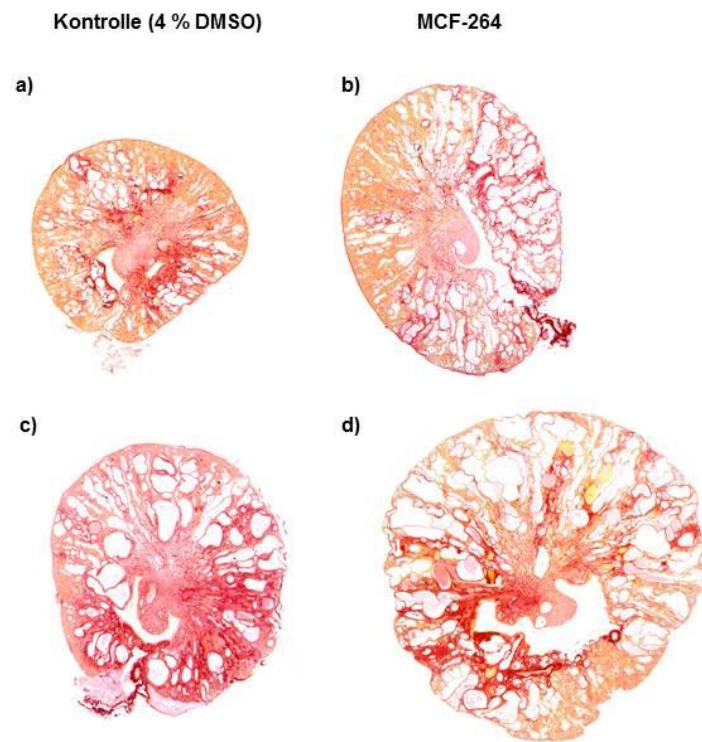


ABBILDUNG 61: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der fibrotischen Veränderungen nach Behandlung mit MCF-264, Sirius-Rot gefärbt. Zu sehen sind unter a) linke Niere der Kontrolle, b) MCF-264 linke Niere, c) rechte Niere der Kontrolle und d) MCF-264 rechte Niere.

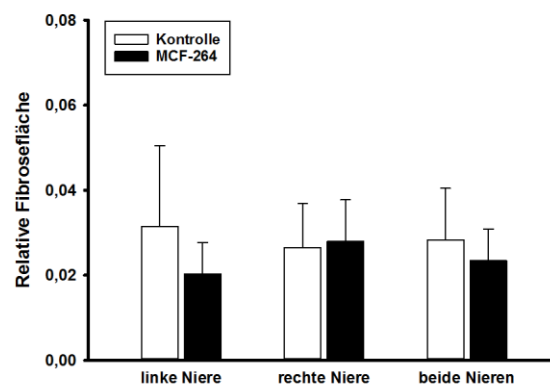


ABBILDUNG 62: Unveränderte relative Fibrosefläche nach Behandlung mit MCF-264. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe MCF-264 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). Ende der Therapiestudie für MCF-264 an Tag 86, für die Kontrolle an Tag 100.

3.2. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 bewirkte im Tiermodell eine Reduktion der zystischen und fibrotischen Veränderungen des Nierenparenchyms

In der vorliegenden Studie war der für OPC-31260 in der Literatur bereits beschriebene protektive Effekt ^{54, 55} auf die Niere nachvollziehbar. Die morphometrische Analyse der histologischen Präparate ließ eine deutliche Reduktion der Zystenausprägung und aller damit verbundenen Veränderungen des Nierenparenchyms erkennen.

OPC-31260 führte im Detail zu einem deutlich geringeren absoluten und relativen Gewicht beider Nieren (Abbildung 63 bis Abbildung 65). Das absolute Nierengewicht war signifikant um 40 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe reduziert ($p=0,001$, $g=|2,29|$), das Verhältnis Nierengewicht/Körpergewicht um 25 % ($p=0,003$, $g=|1,81|$) und das Verhältnis Nierengewicht/Herzgewicht um 47 % ($p=0,002$, $g=|2,20|$). Die Hemmung der Ausprägung der Zysten zeigte sich durch eine signifikante Reduktion aller im Folgenden beschriebenen Parameter. Die relative Zystenfläche beider Nieren war um 61 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe verringert ($p=0,001$, $g=|3,01|$). Die Analyse der relativen Zystenanzahl ergab eine Reduktion um 31 % ($p=0,005$, $g=|1,78|$) und die Zysten waren im Mittel 41 % kleiner als in der Kontrollgruppe (linke Niere: 33 % ↓, $p=0,008$, $g=|1,50|$, rechte Niere: 50 % ↓, $p<0,001$, $g=|3,17|$). Interessant war, dass OPC-31260 einen Einfluss auf die fibrotischen Veränderungen ausübte. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe reduzierte OPC-31260 die gesamte Fibrosefläche beider Nieren um 57 % ($p=0,014$, $g=|1,34|$, Abbildung 63 bis Abbildung 70).

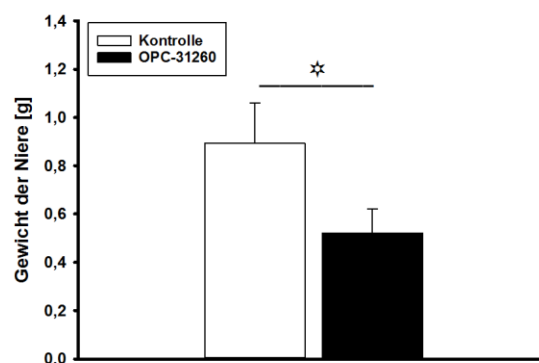


ABBILDUNG 63: OPC-31260 führte zu einer deutlichen Reduktion des absoluten Nierengewichts. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p<0,05$.

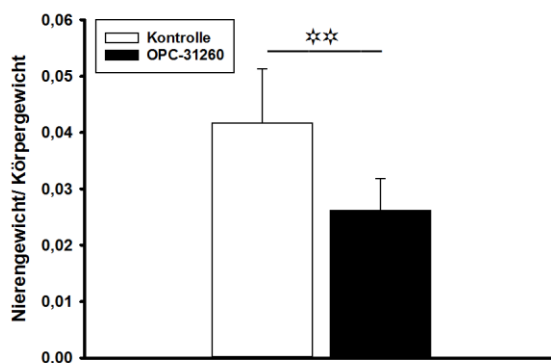


ABBILDUNG 64: Verringertes relatives Nierengewicht im Bezug auf das Körpergewicht nach Behandlung mit OPC-31260. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: p<0,01.

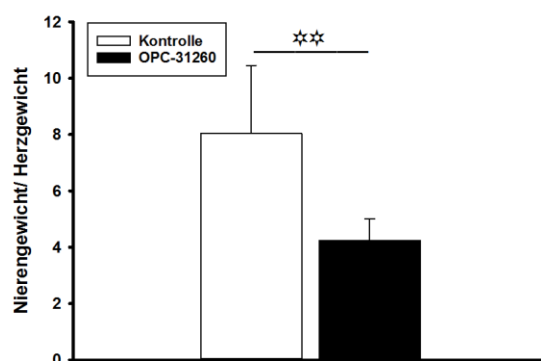


ABBILDUNG 65: Verringertes relatives Nierengewicht im Bezug auf das Herzgewicht nach Behandlung mit OPC-31260. Darstellung der MW \pm SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: p<0,01.

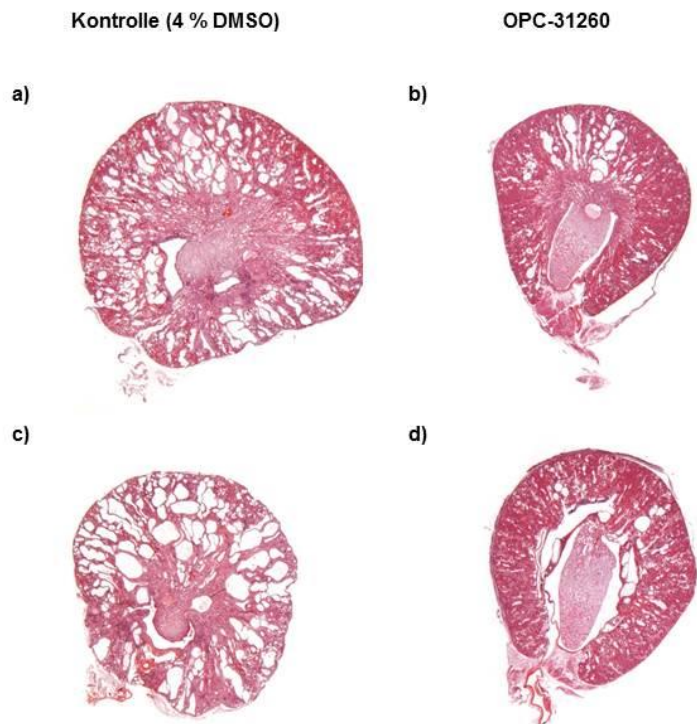


ABBILDUNG 66: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der reduzierten zystischen Degeneration nach Behandlung mit OPC-31260, HE gefärbt. Zu sehen sind unter a) linke Niere der Kontrolle, b) OPC-31260 linke Niere, c) rechte Niere der Kontrolle und d) OPC-31260 rechte Niere.

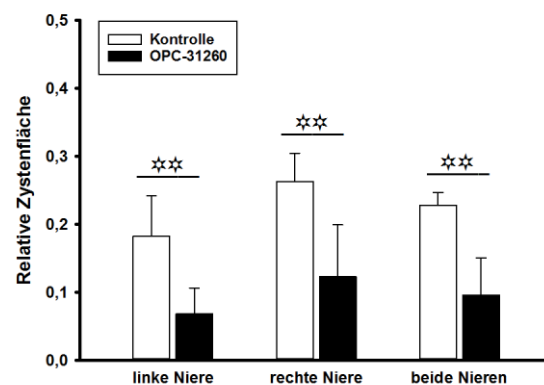


ABBILDUNG 67: OPC-31260 führte zu einer deutlichen Reduktion der relativen Zystenfläche. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: $p < 0,01$.

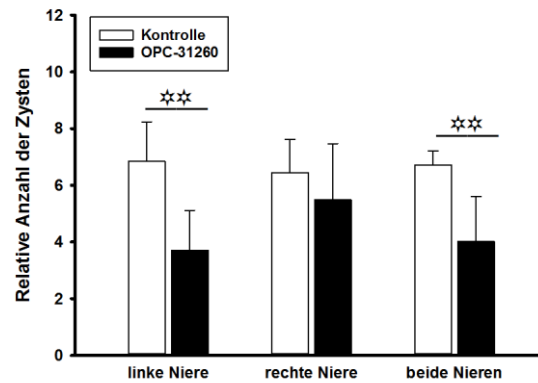


ABBILDUNG 68: Reduzierte relative Anzahl der Zysten nach Behandlung mit OPC-31260. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: p<0,01.

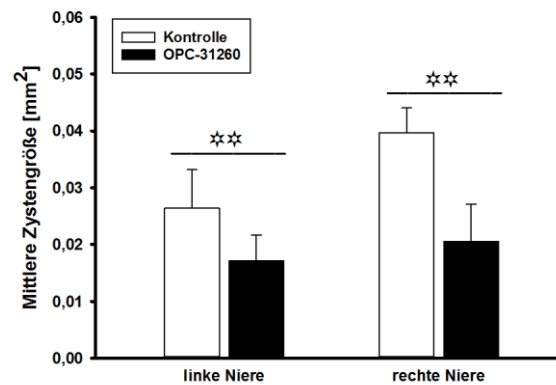


ABBILDUNG 69: Nach Behandlung mit OPC-31260 war sowohl in der linken als auch in der rechten Niere die Zystengröße im Mittel vermindert. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). **: p<0,01.

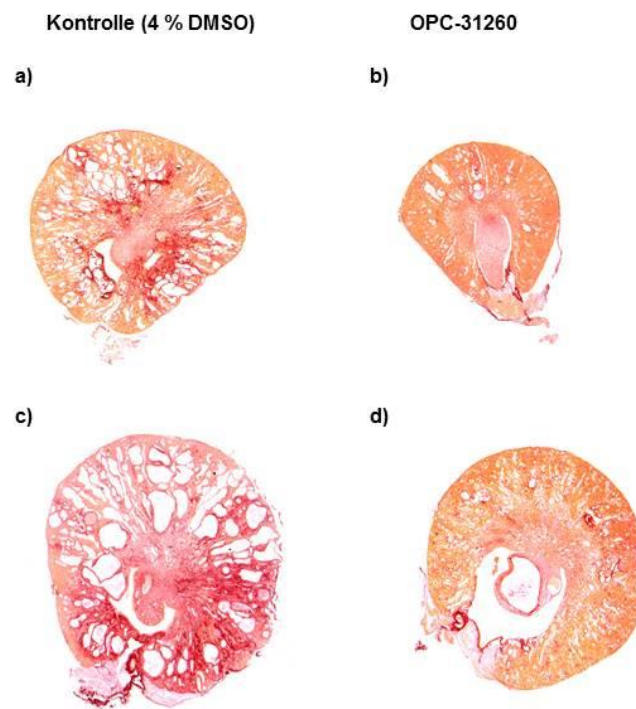


ABBILDUNG 70: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der reduzierten fibrotischen Veränderungen nach Behandlung mit OPC-31260, Sirius-Rot gefärbt. Zu sehen sind unter a) linke Niere der Kontrolle b) OPC-31260 linke Niere, c) rechte Niere der Kontrolle und d) OPC-31260 rechte Niere.

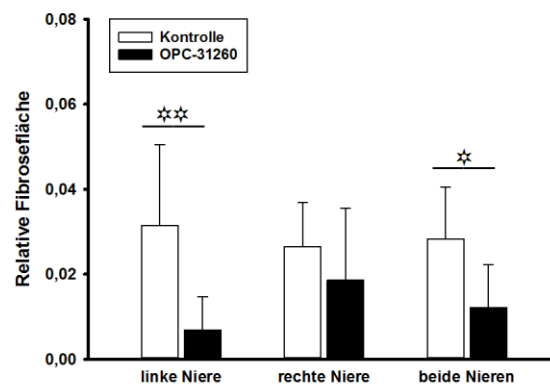


ABBILDUNG 71: Reduzierte relative Fibrosefläche nach Behandlung mit OPC-31260. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe OPC-31260 (n=7) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: p < 0,05, **: p < 0,01.

3.3. Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 hemmt die zystische Degeneration des Nierenparenchyms im Tiermodell

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten zum ersten Mal, dass der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 die Progression der PKD in der CD1^{pcy/pcy} Maus verlangsamt. Sowohl eine Reduktion des Nierengewichts als auch der zystischen Veränderungen im Nierenparenchym konnte nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 beobachtet werden.

Das absolute und relative Nierengewicht war gegenüber der Kontrollgruppe im Mittel um 30 % reduziert (Abbildung 72 bis Abbildung 74). Dieser Unterschied tendierte sowohl für das absolute Nierengewicht als auch für das relative Nierengewicht zu einer statistischen Signifikanz (absolutes Nierengewicht: $p=0,056$, Nierengewicht/Körpergewicht: $p=0,054$, Nierengewicht/Herzgewicht: $p=0,053$). Eine erfolgreiche Hemmung der Bildung und des Wachstums der Zysten spiegelte sich in einer signifikant um 28 % reduzierten relativen Zystenfläche beider Nieren ($p=0,031$, $g=|0,12|$) und in einer um 12 % geringeren relativen Zystenanzahl ($p=0,018$, $g=|1,45|$) im Vergleich zur Kontrollgruppe wider. Überraschend war, dass die mittlere Zystengröße und die Kollageneinlagerungen in das Nierenparenchym von einer Behandlung mit Mambaquaretin-1 unbeeinflusst blieben (Abbildung 72 bis Abbildung 80).

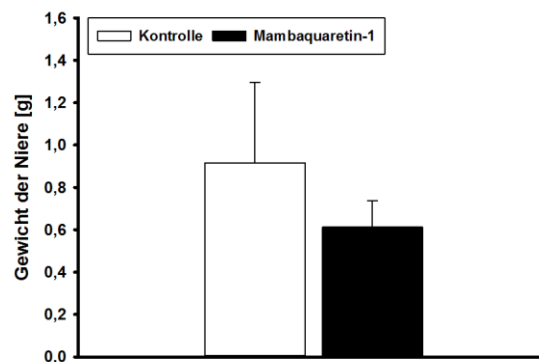


ABBILDUNG 72: Nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 zeigte sich eine zur statistischen Signifikanz tendierende Reduktion des absoluten Nierengewichts. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

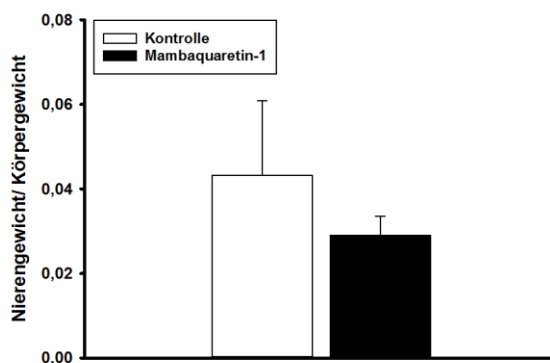


ABBILDUNG 73: Nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 zeigte sich ein zur statistischen Signifikanz tendierendes reduziertes relatives Nierengewicht im Bezug auf das Körpergewicht. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

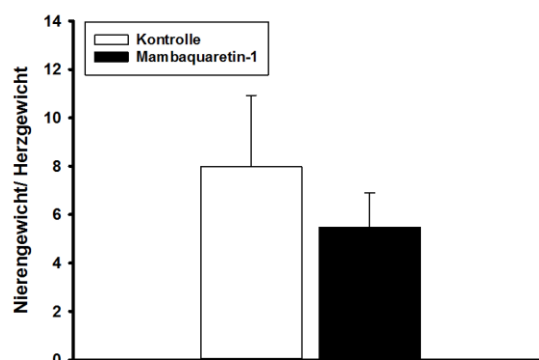


ABBILDUNG 74: Mambaquaretin-1 führte zu einer zur statistischen Signifikanz tendierenden Reduktion des relativen Nierengewichts im Bezug auf das Herzgewicht. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

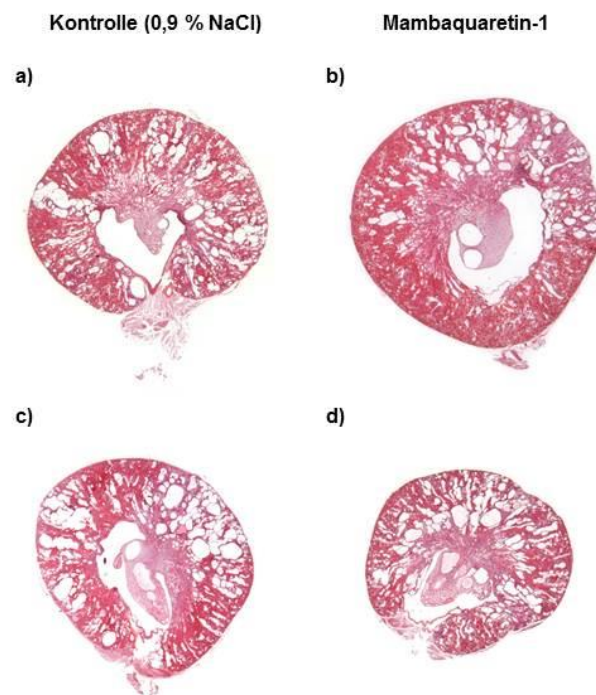


ABBILDUNG 75: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der reduzierten zystischen Degeneration nach Behandlung mit Mambaquaretin-1, HE gefärbt. Zu sehen sind unter a) linke Niere der Kontrolle, b) Mambaquaretin-1 linke Niere, c) rechte Niere der Kontrolle und d) Mambaquaretin-1 rechte Niere.

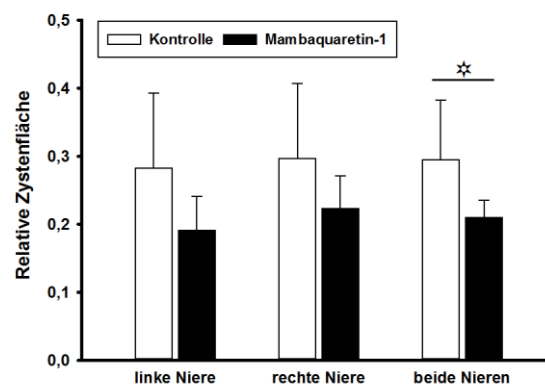


ABBILDUNG 76: Reduzierte relative Zystenfläche nach Behandlung mit Mambaquaretin-1. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$.

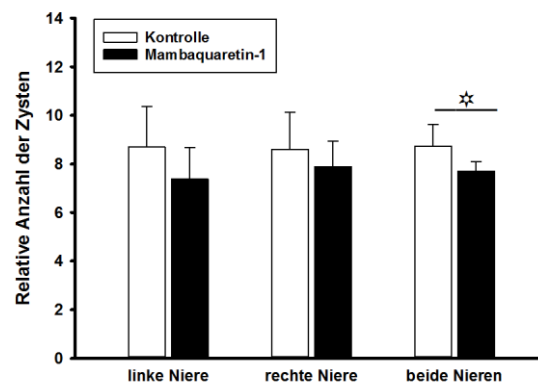


ABBILDUNG 77: Reduzierte relative Anzahl der Zysten nach Behandlung mit Mambaquaretin-1. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7). *: $p < 0,05$.

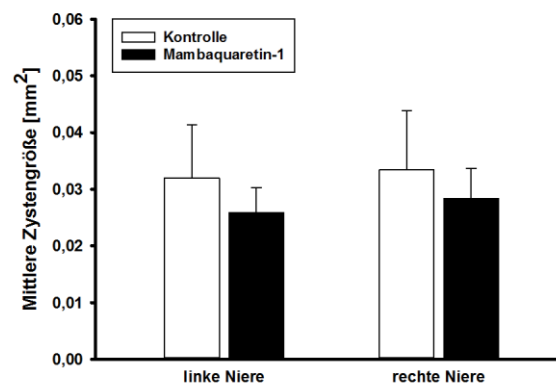


ABBILDUNG 78: Eine Behandlung mit Mambaquaretin-1 zeigte keinen Einfluss auf die mittlere Zystengröße. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

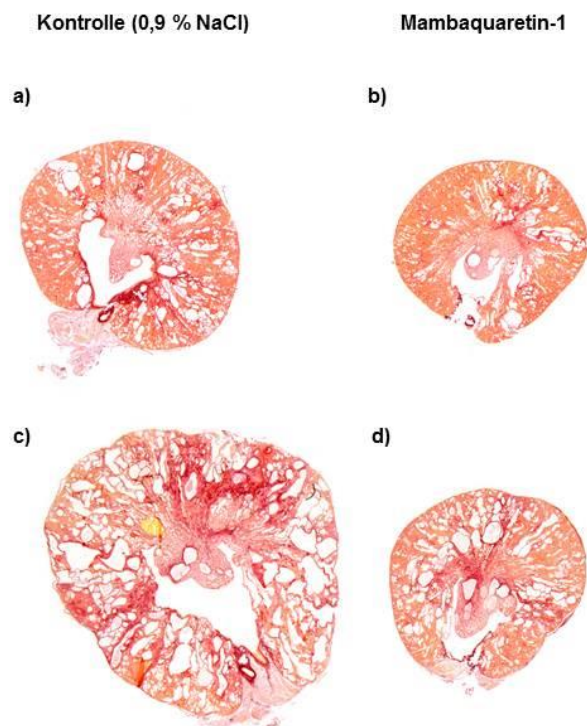


ABBILDUNG 79: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der fibrotischen Veränderungen nach Behandlung mit Mambaquaretin-1, Sirius-Rot gefärbt. Zu sehen sind unter a) linke Niere der Kontrolle, b) Mambaquaretin-1 linke Niere, c) rechte Niere der Kontrolle und d) Mambaquaretin-1 rechte Niere.

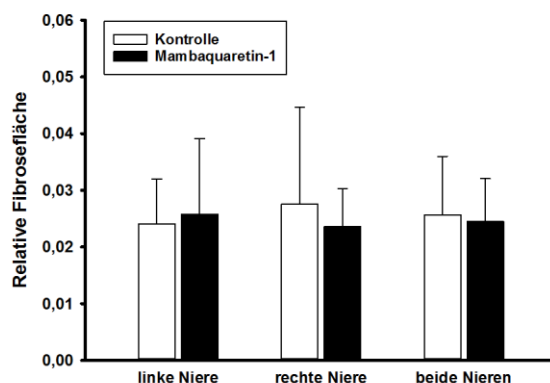


ABBILDUNG 80: Eine Behandlung mit Mambaquaretin-1 zeigte keinen Einfluss auf die relative Fibrosefläche. Darstellung der MW ± SD der Verumgruppe Mambaquaretin-1 (n=6) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (n=7).

4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Therapiestudie

Zur Übersicht sind die Ergebnisse der Therapiestudie im Folgenden und in Tabelle 10 zusammengefasst.

- Das Allgemeinbefinden aller Tiere, mit Ausnahme der Verumgruppe MCF-264, war über den Studienzeitraum von 100 Tagen ungestört und sie nahmen regelmäßig Futter und Wasser auf. Nach Behandlung mit MCF-264 wiesen die Tiere zum Ende der Therapiestudie ein reduziertes Allgemeinbefinden auf, so dass der Versuch für diese Gruppe bereits an Tag 86 beendet werden musste.
- Das Körpergewicht aller Mäuse zeigte zu Beginn des Versuchs einen progredienten Anstieg, stieg individuell auch im Versuchsverlauf weiter an, blieb gleich oder nahm geringfügig ab. Diese Ergebnisse sind unabhängig davon, ob und mit welcher Substanz die Mäuse behandelt wurden.
- Die Konzentrationen von Harnstoff, Kreatinin und Gesamtprotein im Urin der Kontrolltiere sowie der mit MCF-264 behandelten Tiere sanken über den Studienzeitraum geringgradig ab. Die Verumgruppe OPC-31260 zeigte keine Veränderungen und Mambaquaretin-1 führte zu einer Reduktion dieser Parameter im Vergleich zu dem Basiswert an Tag 0 und im Vergleich zu der Kontrollgruppe.
- Die Ergebnisse für die Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Blutplasma zeigten keine eindeutige Tendenz. Die Harnstoffkonzentration war gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (MCF-264), vermindert (OPC-31260) oder gleich (Mambaquaretin-1). Die Kreatininkonzentration aller Verumgruppen war im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe gleich (OPC-31260) oder erniedrigt (MCF-264, Mambaquaretin-1).

→ Die vorgelegten Ergebnisse dieser Studie lassen den Schluss zu, dass die polyzystische Nierenerkrankung in der CD1^{pcy/pcy} Maus bis zu einem Alter von 24 Wochen zu keinen klinischen Symptomen führte. Die Nierenfunktion blieb bis zu diesem Zeitpunkt soweit erhalten, dass keine messbaren Veränderungen der Nierenfunktionsparameter entstanden. Darüber hinaus konnten über den Studienzeitraum weder für MCF-264 noch für OPC-31260 oder Mambaquaretin-1 unerwünschte Wirkungen auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere, die über die durch die PKD bedingten Symptome hinaus gingen, beobachtet werden. Das reduzierte Allgemeinbefinden der Verumgruppe MCF-264 war vermutlich eine direkte Folge der Effekte von MCF-264 auf die Entwicklung der PKD. Die Analyse der Daten zeigte eine gesteigerte Progression der PKD und der damit verbundenen Veränderungen der Niere nach Behandlung mit MCF-264.

- MCF-264 und OPC-31260 führten nicht zu den erwarteten Effekten auf Volumen und Osmolalität des Urins. Für die Gruppe OPC-31260 wurden teilweise sogar geringere Urinvolumina und parallel dazu eine erhöhte Urinsomolalität im Vergleich zu der Kontrollgruppe gemessen. Mambaquaretin-1 führte über den gesamten Studienzeitraum von 100 Tagen zu einem Anstieg des Urinvolumens in Korrelation mit einem Abfall der Urinosmolalität.

- Die Kationen- und Anionenkonzentrationen im Urin sanken über die Dauer der Therapiestudie in beiden Kontrollgruppen (4 % DMSO und 0,9 % NaCl) sowie in der Verumgruppe MCF-264 geringfügig ab. OPC-31260 führte zu keinen Veränderungen der Elektrolytausscheidung. Die Verumgruppe Mambaquaretin-1 zeigte zu allen Messzeitpunkten eine Reduktion der Elektrolytkonzentration im Urin gegenüber der Kontrollgruppe.

→ Weder MCF-264 noch OPC-31260 übten trotz der angenommenen agonistischen bzw. antagonistischen Blockade des V2-Rezeptors messbare Effekte auf Volumen und Osmolalität des Urins aus. Für Mambaquaretin-1 ist davon auszugehen, dass es *in vivo* den V2-Rezeptor sicher und ohne Gewöhnungseffekt über die Dauer der Therapiestudie blockierte. Es wurde sowohl ein Anstieg des Urinvolumens als auch eine Reduktion der Urinosmolalität nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 gemessen und diese Veränderungen blieben über den Studienzeitraum von 100 Tagen stabil. Darüber hinaus deuteten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass der diuretische Effekt von Mambaquaretin-1 durch eine vermehrte Ausscheidung reinen Wassers ohne Elektrolytverlust entsteht.

- Alle an der Niere untersuchten Parameter (absolutes und relatives Nierengewicht, relative Zystenfläche, mittlere Größe und relative Anzahl der Zysten) waren in der Verumgruppe OPC-31260 im Vergleich zu der Kontrollgruppe reduziert. Mambaquaretin-1 führte zu einer weniger stark ausgeprägten relativen Zystenfläche und zu einer reduzierten relativen Zystenanzahl. Nach Behandlung mit MCF-264 zeigte sich eine Zunahme des Nierengewichts im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

→ Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 führte erwartungsgemäß zu einer beschleunigten Progression der zystischen Degeneration der Niere. Es ist anzunehmen, dass die Stimulation der Aktivität der Adenylatzyklase über den V2-Rezeptor in einer weiteren Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels resultiert und damit dessen Wirkung auf die Entstehung und das Wachstum der Zysten verstärkt. Im Detail zeigte sich nach Behandlung mit MCF-264 eine deutliche Zunahme des Nierengewichts und eine mäßige Zunahme der Zystenausprägung. Dieses beschleunigte Voranschreiten der PKD führte trotz des verfrühten Endpunkts der Therapiestudie für die Verumgruppe MCF-264 an Tag 86 zu signifikanten Unterschieden im Nierengewicht im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Endpunkt Tag 100).

→ Für den Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten OPC-31260 konnte eine Mäßigung der Progression der PKD durch die signifikante Reduktion aller erhobenen Parameter an der Niere beobachtet werden. Interessant war, dass OPC-31260 auch die Fibrose des Nierenparenchyms beeinflusste.

→ Dem erstmals untersuchten Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten Mambaquaretin-1 konnte eine Effektivität gegen die Zystenausprägung im Nierenparenchym und gegen die damit verbundenen Veränderungen zugeschrieben werden. Es führte neben der Reduktion des Nierengewichts auch zu einer signifikant geringeren relativen Zystenfläche im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

TABELLE 10: Übersicht über die Ergebnisse der Therapiestudie. ↑/↓: Zunahme/Abnahme des untersuchten Parameters gegenüber der Kontrollgruppe →: Keine messbare Abweichung von den Ergebnissen der Kontrollgruppe.

Untersuchter Parameter	MCF-264	OPC-31260	Mambaquaretin-1
Körpergewicht	→	→	→
Urinvolumen	→	→	↑
Urinosmolalität	→	↑	↓
Harnstoff im Urin	→	↑	↓
Kreatinin im Urin	→	↑	↓
Kationen im Urin	→	↑	↓
Anionen im Urin	→	↑	↓
Gesamtprotein im Urin	→	↑	↓
Absolutes Nierengewicht	↑	↓	→
Nierengewicht/Körpergewicht	↑	↓	→
Nierengewicht/Herzgewicht	→	↓	→
Zystenfläche/Nierenfläche	→	↓	↓
Relative Anzahl der Zysten	→	↓	↓
Mittlere Größe der Zysten	Links: ↑ Rechts: →	Links: ↓ Rechts: ↓	Links: → Rechts: →
Fibrosefläche/Nierenfläche	→	↓	→
Harnstoff im Blutplasma	↑	↓	→
Kreatinin im Blutplasma	↓	→	↓

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass in einem Mausmodell der polyzystischen Nierenerkrankung über die Stimulation und Inhibition des V2-Rezeptors die Ausprägung der zystischen Degeneration des Nierenparenchyms moduliert werden kann. Der Vasopressin-Rezeptor-Agonist MCF-264 beschleunigte durch die Stimulation des V2-Rezeptors die Progression der PKD. Dagegen führte eine Blockade des V2-Rezeptors durch die Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten OPC-31260 und Mambaquaretin-1 zu einem Rückgang der zystischen Veränderungen in der Niere.

Die Pathogenese einer zystischen Degeneration der Niere ist bis heute nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass die ADPKD als hereditäre Erkrankung durch eine Mutation im Gen *PKD1* oder im Gen *PKD2* verursacht wird. Das Genprodukt von *PKD1* – Polycystin-1 – ist ein Transmembranprotein mit bisher unbekannter Funktion²¹, das mit dem Genprodukt von *PKD2* – Polycystin-2 – interagiert. Polycystin-2 scheint ein nicht-selektiver Kationen-Kanal zu sein, der die Kalzium-Homöostase in der Zelle reguliert⁶⁶. Besonders hervorzuheben ist die Erkenntnis über die Lokalisation des Polycystin-Komplexes und nahezu aller bei dem Krankheitskomplex der PKD betroffenen Genprodukte im primären Zilium. Auch verschiedene Zelltypen außerhalb der Niere können ein primäres Zilium tragen, was die ADPKD zu einer systemischen Erkrankung werden lässt^{28, 67}. Um die herausragende Rolle des primären Ziliums hervorzuheben, werden die polyzystischen Nierenveränderungen auch als Ziliopathien bezeichnet³³. Nicht eindeutig geklärt ist die Entstehung und Ausdifferenzierung der Zysten im Verlauf der ADPKD. Zysten entwickeln sich aus renalen Tubuli, vor allem aus dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr. Zunächst bilden sich kleine Erweiterungen aus denen durch progrediente Zellproliferation und Flüssigkeitssekretion schließlich flüssigkeitsgefüllte Hohlräume verschiedener Größe entstehen. Interessant ist, dass nur circa 1 % der Nephrone in der humanen Niere tatsächlich Zysten ausbildet⁶⁸, obwohl alle Tubulusepithelzellen die Genmutation tragen. Die Second-Hit-Theorie dient der Erklärung dieser Besonderheit: Es wird angenommen, dass die vererbte Mutation zwar Voraussetzung aber nicht zwangsläufig Auslöser der Zystenentstehung ist, sondern dass erst eine zweite, somatische Mutation den völligen Funktionsverlust des Polycystin-Komplexes bedingt und im Weiteren über eine gesteigerte Zellproliferation zur Zystenbildung führt⁶⁸⁻⁷⁰. Die gesteigerte Proliferation veränderter Zellen und die Flüssigkeitssekretion in das Zystenlumen wird vor allem durch den Botenstoff cAMP – ein zentraler Faktor in der Entstehung und im Wachstum der Zysten – ausgelöst^{26, 35}. Der durch die Mutation bedingte Mangel am Polycystin-Komplex führt in der Zelle zu einer gestörten Kalzium-Homöostase, zu einer erhöhten Aktivität der Adenylatzyklase und im Weiteren zu einer daraus resultierenden Akkumulation von cAMP im Zytoplasma²².

Da die zystische Degeneration letztendlich die Erkrankung mit allen Symptomen und Begleiterscheinungen bedingt, ist das primäre Ziel einer spezifischen Therapie die Hemmung der Zystenbildung. Aktuelle Studien zielen auf Möglichkeiten zur Modulation des intrazellulären cAMP-Spiegels^{13, 39}. Ein Modulationsweg führt über die intrazelluläre an die Adenylatzyklase gebundene Signalkaskade am Vasopressin-Rezeptor V2, die über ihren direkten Einfluss auf den cAMP-Spiegel eine einzigartige Rolle in der Zystenformation zu spielen scheint^{38, 71}. Die Idee ist, dass eine Blockade des V2-Rezeptors mit Hilfe eines Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten über eine Reduktion des cAMP-Spiegels die Progression der zystischen Degeneration verlangsamt. Studien im Tiermodell und klinische Studien am Patienten konnten für die Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten OPC-31260 und OPC-41061 (internationaler Freiname: Tolvaptan) eine Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels und eine effektive Hemmung der Progression der PKD nachweisen^{26, 50, 72}. Allerdings traten unter der Behandlung mit Tolvaptan unerwünschte Wirkungen auf, die zu einer schlechten Akzeptanz durch die Patienten führten und die Anwendbarkeit von Tolvaptan als Therapie der PKD in Frage stellen⁵⁰. Dennoch erwies sich die Modulation des cAMP-Spiegels über den V2-Rezeptor als wirksam gegenüber der Zystenformation, so dass die Suche nach Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten in anderen Stoffklassen zur Entdeckung eines hoch-potenten selektiven Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten aus dem Gift der Blattgrünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) führte, der von dem Entdecker Nicolas Gilles (CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich) als Mambaquaretin-1 bezeichnet wurde. In *in vitro* Untersuchungen zeigte Mambaquaretin-1 eine hohe Affinität für den V2-Rezeptor und blockierte ihn auch nach Zugabe von Vasopressin vollständig (unveröffentlichte Daten). In der vorliegenden Studie wurde Mambaquaretin-1 auf Basis der Ergebnisse der vorangegangenen Zellkulturexperimente von Nicolas Gilles zum ersten Mal in einem *in vivo* Modell der PKD auf seine Wirksamkeit gegen die Zystenbildung überprüft. Der bereits im Tiermodell untersuchte Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 diente als Positivkontrolle für den protektiven Effekt auf die Niere^{26, 47, 56}. Ferner sollte gezeigt werden, dass eine Stimulation des V2-Rezeptors über den Vasopressin-Rezeptor-Agonisten MCF-264 die Zystenbildung intensiviert.

- *Dosisabhängige Effekte von MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 auf Volumen und Osmolalität des Urins in einem Mausmodell der PKD*

Zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten stellen Tiermodelle als komplexe biologische Systeme sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin den Schritt zwischen *in vitro* gewonnenen Forschungsergebnissen und klinischen Studien am Patienten dar. Die CD1^{pcy/pcy} Maus ist ein exzellentes Modell zur Untersuchung der Entstehung, Progression und Folgen einer zystischen Degeneration der Niere⁵⁷ und wurde bereits in mehreren Studien zur PKD verwendet^{26, 73, 74}. Die CD1^{pcy/pcy} Maus entwickelt aufgrund einer Mutation im Gen *NPHP3* eine langsam progressive Form der ARPKD⁵⁷. Trotz der Unterschiede im Erbgang sind die zystischen Veränderungen des Nierenparenchyms und der Krankheitsverlauf in diesem Mausmodell mit der humanen ADPKD vergleichbar. Bereits *in utero* sind bei der CD1^{pcy/pcy} Maus segmental geringgradige Dilatationen der distalen Tubuli und der Sammelrohre zu sehen, die sich bis zur 8. Lebenswoche zu deutlich sichtbaren Zysten ausweiten⁵⁷. Begleitend können, ähnlich wie bei der humanen ADPKD, eine Gewichts- und Volumenzunahme der Nieren sowie im Endstadium der Erkrankung, etwa ab der 18. Lebenswoche, chronisch entzündliche Infiltrate im Nierenparenchym beobachtet werden.

Bis zu diesem Zeitpunkt zeigen die Mäuse eine physiologische Entwicklung und ein ihrem Alter entsprechendes Körpergewicht⁵⁷. Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Studie ist der Nachweis einer erhöhten Expression von cAMP, Aquaporin-2 und dem V2-Rezeptor in den zystisch veränderten Nieren der CD1^{pcy/pcy} Maus. Zudem zeigen die Mäuse ein Defizit in der Fähigkeit zur Harnkonzentrierung²⁶.

Vasopressin ist ein Schlüsselmolekül zur Regulierung der ausgeschiedenen Urinmenge. Seine Bindung an den renalen V2-Rezeptor bewirkt über den Einbau von Wasserkanälen in die luminale Zellmembran der Tubulusepithelzellen eine vermehrte Resorption von Wasser aus dem Harn und eine daraus resultierende Harnkonzentrierung. Die verwendeten Substanzen MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 entfalten ihre Wirkung über den V2-Rezeptor, so dass Veränderungen der Urinproduktion nach Applikation der Substanzen zu erwarten sind. Vor Beginn der Therapiestudie wurde der Effekt von MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 auf Urinvolumen und Urinosmolalität in Abhängigkeit von der Applikationsart und von der Dosierung untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass zwischen der intraperitonealen und der subkutanen Applikationsart weder für MCF-264 noch für OPC-31260 oder Mambaquaretin-1 ein signifikanter Unterschied bestand. Es ist davon auszugehen, dass die Resorption der verwendeten Substanzen in die Zirkulation über beide Applikationswege vergleichbar ist. MCF-264 führte trotz der Verwendung hoher Dosierungen (10 µmol/kg und 20 µmol/kg) zu keinen Veränderungen des Urinvolumens und der Urinosmolalität. Ferner zeigte eine Behandlung mit OPC-31260 überraschenderweise keinen diuretischen Effekt im verwendeten Tiermodell und es konnte keine Abweichung der Urinosmolalität festgestellt werden. In einer Studie zu den Auswirkungen von OPC-31260 in der PCK Ratte, einem Tiermodell der humanen ARPKD, wurden zu Beginn der Behandlung erhöhte Urinvolumina gemessen, die sich allerdings im Anschluss wieder der Kontrollgruppe angleichen. Auf die Urinosmolalität übte OPC-31260 auch in dieser Studie keinen Einfluss aus²⁶. Gattone et al. geht davon aus, dass der diuretische Effekt durch den protektiven Effekt von OPC-31260 auf die Niere aufgehoben wird²⁶. Dagegen führte Mambaquaretin-1 bereits nach der ersten Injektion in einer Dosierung von 0,1 µmol/kg und von 1 µmol/kg zu einer deutlichen Erhöhung des Urinvolumens mit gleichzeitiger Reduktion der Urinosmolalität. Auch mit einer vergleichsweise niedrigen Dosierung von 0,01 µmol/kg bewirkte Mambaquaretin-1 eine Diurese. Diese Ergebnisse erfüllten die Erwartungen und boten einen hervorragenden Ausgangspunkt für die Untersuchungen der Effekte von Mambaquaretin-1 auf die Zystenformation im Rahmen der sich anschließenden Therapiestudie im Tiermodell. Trotz der fehlenden Wirkung von MCF-264 und OPC-31260 auf Volumen und Osmolalität des Urins wurden sie in die Therapiestudie aufgenommen, da in dieser Studie vorrangig die Auswirkungen auf die zystische Degeneration der Niere untersucht werden sollten. Der aktuelle Stand der Wissenschaft und die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Studie zeigten, dass eine Modulation der zystischen Degeneration unabhängig von Veränderungen der Urinausscheidung möglich ist^{26, 71}.

- *Allgemeinbefinden und Entwicklung des Körpergewichts der CD1^{pcy/pcy} Mäuse im Verlauf der Therapiestudie*

Auf Basis des Tierschutzgesetzes (§7 TierSchG) sind Schmerzen, Leiden und Schäden der zu Versuchszwecken genutzten Tiere auf das unerlässliche Maß im Rahmen des Studiendesigns zu reduzieren. Es ist von besonderer Wichtigkeit das Allgemeinbefinden der Tiere zu überwachen und den Versuch bei Abweichungen gegebenenfalls zu beenden. Um diesem Anspruch gerecht zu werden, wurden die Mäuse täglich in Augenschein genommen. Verhalten in der Gruppe, Bewegung im Käfig, der Pflege- und Ernährungszustand, Futter- und Wasseraufnahme sowie Kot- und Urinabsatz der Gruppe und sonstige Auffälligkeiten wurden täglich beurteilt. Als objektiver Parameter wurde regelmäßig das Körpergewicht der Tiere kontrolliert ⁷⁵.

Die Einschätzung des Allgemeinbefindens ergab lediglich für die Mäuse der Verumgruppe MCF-264 Abweichungen zum Ende der Therapiestudie. Für diese Gruppe musste der Versuch daher bereits an Tag 86 beendet werden. Die weiteren gewonnenen Ergebnisse zeigten eine beschleunigte Progression der PKD nach Behandlung mit MCF-264, so dass das reduzierte Allgemeinbefinden dieser Mäuse vermutlich auf die mit der PKD assoziierten Symptome zurückzuführen und nicht als unerwünschte Wirkung von MCF-264 zu werten ist. Die Tiere der Verumgruppen OPC-31260 und Mambaqueletin-1 sowie beider Kontrollgruppen zeigten über den gesamten Studienzeitraum von 100 Tagen einen guten Gesundheitszustand und ein ungestörtes Allgemeinbefinden ohne weitere Auffälligkeiten. Alle behandelten und unbehandelten Tiere nahmen unabhängig von der verwendeten Substanz zu Beginn der Therapiestudie und individuell auch über den weiteren Studienzeitraum an Körpergewicht zu, hielten ihr Gewicht oder nahmen in vernachlässigbarem Maße ab. Die Mäuse aller Verumgruppen zeigten in ihrer Entwicklung keine Abweichungen von den Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beschreibung der CD1^{pcy/pcy} Maus ⁵⁷. Die Tiere der Verumgruppe OPC-31260 waren bereits vor Beginn der Therapiestudie geringfügig leichter als die Tiere der Kontrollgruppe. Dies galt für alle folgenden Messzeitpunkte gleichermaßen. Da diese Abweichung bereits vor Beginn der Behandlung mit OPC-31260 bestand, ist sie durch die Individualität der Tiere und ihre zufällige Einteilung in die Gruppen zu begründen. Des Weiteren sind diese Unterschiede zu vernachlässigen, da die Entwicklung des Körpergewichts über die Zeit jener der Kontrollgruppe entsprach.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit MCF-264, OPC-31260 und Mambaqueletin-1 von den Mäusen gut toleriert wurde und keine unerwünschten Begleiterscheinungen, die über die durch die PKD bedingten Symptome hinausgingen, über den Studienzeitraum auftraten.

- *Effekt von MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 auf die Nierenfunktion*

Es ist bekannt, dass Patienten mit früher ADPKD an einer leichten Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Harnkonzentrierung leiden, die sich mit der Progression der Erkrankung zu einem schwerwiegenden Defizit entwickelt ⁷⁶. Diese Patienten scheiden Urin mit sinkender Osmolalität aus und weisen aufgrund der entstehenden Dehydratation eine steigende Osmolalität des Blutplasmas auf. Auch für die CD1^{pcy/pcy} Maus ist ein Defizit in der Harnkonzentrierung beschrieben ²⁶. Als Reaktion des Körpers auf den Flüssigkeitsverlust steigt die Vasopressin-Konzentration im Blut ⁷⁷. Vasopressin wiederum nimmt über die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels direkt Einfluss auf die Zystenbildung und beschleunigt die Progression der PKD, so dass diese Kausalität in der Folge in einer terminalen Niereninsuffizienz resultiert ⁷¹.

Die Analyse von Volumen und Osmolalität des Urins unbehandelter Versuchstiere ergab bis zum Ende der Therapiestudie langsam ansteigende Urinvolumina in Korrelation mit sinkender Urinosmolalität. Diese Veränderungen sind als mild einzuordnen und stehen in keinem Verhältnis zu der beschriebenen, in einem Alter von 24 Wochen bereits schon beträchtlicher Ausprägung der PKD der CD1^{pcy/pcy} Maus ⁵⁷. Nach Behandlung mit dem Vasopressin-Rezeptor-Agonisten MCF-264 verhielten sich die Werte für Volumen, Osmolalität und Elektrolytkonzentration im Urin vergleichbar zu den Ergebnissen unbehandelter Tiere. Die Hypothese, dass MCF-264 seine Wirkung über eine Stimulation des V2-Rezeptors vermittelt, konnte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden, da auf eine agonistische Bindung an den V2-Rezeptor eine Antidiurese mit einer Ausscheidung geringerer Urinvolumina folgt ⁷¹. Für OPC-31260 konnte in der vorliegenden Studie, wie auch in einer Untersuchung in der PCK Ratte beschrieben ²⁶, kein diuretischer Effekt beobachtet werden. Da die Osmolalität und die Elektrolytkonzentration im Urin unbehandelter Tiere über den Studienzeitraum sank, wurden zum Ende der Therapiestudie signifikant erhöhte Werte nach Behandlung mit OPC-31260 ermittelt. Nach einer Blockade des V2-Rezeptors kommt es durch den reduzierten Einbau von Wasserkanälen in die luminale Membran der Tubulusepithelzellen zu einer verminderten Resorption von Wasser aus dem Harn, so dass in der Folge mit einer Ausscheidung erhöhter Urinvolumina zu rechnen ist. Die Annahme, dass OPC-31260 seine Wirkung über den V2-Rezeptor vermittelt, ist aufgrund des fehlenden diuretischen Effekts sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Literatur ²⁶ zu bezweifeln. Dagegen führte Mambaquaretin-1 sowohl in den Vorversuchen als auch im Rahmen der Therapiestudie zu einer Diurese. Da die Mäuse nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 eine über den gesamten Studienzeitraum von 100 Tagen unverändert hohe Urinproduktion zeigten, ist davon auszugehen, dass Mambaquaretin-1 *in vivo* an den V2-Rezeptor bindet und ihn sicher und ohne Gewöhnungseffekt über 100 Tage blockiert. Darüber hinaus führten die im Verlauf der Therapiestudie gemessene niedrige Urinosmolalität und Elektrolytkonzentration im Urin zu der Annahme, dass die Diurese durch eine vermehrte Ausscheidung reinen Wassers bedingt ist und es zu keinem Elektrolytverlust unter der Behandlung von Mambaquaretin-1 kommt. Diese Hypothese sollte im Rahmen folgender Studien über die zusätzliche Analyse der Trinkmenge der Tiere und der Elektrolytkonzentration im Blut bestätigt werden, da ein Verlust von Elektrolyten einen limitierenden Faktor für die Anwendbarkeit von Mambaquaretin-1 als Therapeutikum der PKD darstellt.

Zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Niere und der intakten Beschaffenheit des glomerulären Filters und des Tubulussystems ist die Messung von Harnstoff und Kreatinin in Blut und Urin und die Messung von Protein im Urin unerlässlich. Diese Parameter sind Standard zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung einer Niereninsuffizienz sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin. Harnstoff ist das Endprodukt aus dem Proteinstoffwechsel und wird überwiegend renal ausgeschieden. Eine Azotämie kann bei erhöhter Proteinzufuhr über die Nahrung und bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz auftreten. Kreatinin wird von der gesunden Niere fast vollständig durch die glomeruläre Filtration ausgeschieden und ist damit ein spezifischer Marker für die Nierenfunktion. Allerdings ist eine Erhöhung der Kreatininkonzentration im Blutplasma erst bei einer Schädigung von circa 60 % des Nierenparenchyms messbar, so dass zur Früherkennung einer Nephropathie zusätzlich die Messung der Proteinausscheidung im Urin sinnvoll ist. Größere Proteine werden in der gesunden Niere vom glomerulären Filter zurückgehalten und kleinere Proteine, die den Filter passieren, werden tubulär resorbiert. Eine Schädigung der Glomerula und der proximalen Tubuli führt zu einer Proteinurie.

Sowohl die Tiere der Verum- als auch der Kontrollgruppen zeigten über den gesamten Studienzeitraum sinkende oder gleichbleibende Werte für Harnstoff und Kreatinin im Urin. Ferner konnte der Nachweis einer Proteinurie für keine der Gruppen geführt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Nieren trotz des umfassenden zystischen Umbaus des Nierenparenchyms noch in der Lage sind, die Einschränkung ihrer Funktionsfähigkeit zu kompensieren. Die Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Blutplasma waren nicht konsistent. Die Verumgruppe MCF-264 zeigte eine erhöhte Harnstoffkonzentration mit gleichzeitiger Verminderung der Kreatininkonzentration im Vergleich zu der Kontrollgruppe. OPC-31260 führte zu einer Reduktion der Harnstoffkonzentration und für Mambaquaretin-1 wurde eine erniedrigte Kreatininkonzentration beobachtet. Der Zusammenhang zwischen der in dieser Studie nachgewiesenen beschleunigten Progression der PKD nach Behandlung mit MCF-264 und die gleichzeitig gemessene Reduktion des Plasmakreatinins im Vergleich zu der Kontrollgruppe ist nicht evident und lässt in der Folge keine zweifelsfreie Interpretation der Ergebnisse für Harnstoff und Kreatinin der Verumgruppen OPC-31260 und Mambaquaretin-1 zu. Möglicherweise sollten die Harnstoff- und Kreatininwerte im Blutplasma in nachfolgenden Studien mehrfach im Versuchsverlauf bestimmt werden, um die Entwicklung dieser Parameter im Zusammenhang mit der Progression der PKD über die Zeit beurteilen zu können.

- *Effekte von MCF-264, OPC-31260 und Mambaquaretin-1 auf die Morphologie der erkrankten Niere in einem Mausmodell der PKD*

Aktuelle Studien ordnen dem intrazellulären Botenstoff cAMP eine zentrale Rolle in der Zystenformation zu^{13, 39}. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bekräftigen diese Hypothese. Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Akkumulation von cAMP im Zytoplasma der Tubulusepithelzellen durch die Stimulation des V2-Rezeptors mit Hilfe des Vasopressin-Rezeptor-Agonisten MCF-264 die Progression der PKD beschleunigt. Dagegen hemmte die Blockade des V2-Rezeptors mit Hilfe des Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten OPC-31260 die zystische Degeneration des Nierenparenchyms. Die Beobachtungen für OPC-31260 in dieser Studie decken sich mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft^{26, 47}.

Von besonderer klinischer Relevanz ist der Nachweis der Wirksamkeit von Mambaquaretin-1 gegen die Zystenformation. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Mambaquaretin-1 in einem *in vivo* Modell der PKD zu einem Rückgang der zystischen Veränderungen des Nierenparenchyms führt.

Zysten sind funktionslose mit Epithel ausgekleidete flüssigkeitsgefüllte Hohlräume verschiedener Größe, die in jedem Segment des Nephrons, insbesondere aber im distalen Tubulus und im Sammelrohr, auftreten können⁷⁸. Eine vermehrte Proliferation in Korrelation mit einer reduzierten Differenzierung der Tubulusepithelzellen führt zur Bildung kleiner Blasen, die durch weitere Proliferation und Sekretion in ihr Lumen stetig an Größe zunehmen³⁹. Die progrediente Bildung und Größenzunahme der Zysten führen zu einer Druckatrophie intakter Nephronen und in der Folge zu einer Kollageneinlagerung in die betroffenen Bereiche des Nierenparenchyms. Diese Vorgänge resultieren in einem progredienten Verlust funktionsfähiger Nephronen und in einer massiven Volumen- und Gewichtszunahme der Nieren^{41, 43}. Diese verdrängen die umliegenden Organe im Abdomen, was zu Schmerzzuständen der betroffenen Patienten führt. Des Weiteren bieten die Flüssigkeitsansammlungen in den Zysten einen perfekten Nährboden für Bakterien, die eine Einwanderung von Leukozyten und entzündlicher Infiltrate nach sich ziehen^{13, 65}. Die zystische Degeneration des Nierenparenchyms und der damit einhergehende Funktionsverlust der Niere prägen das Bild der PKD. Oberstes Ziel einer kausalen Therapie der PKD muss die Einschränkung der Zystenbildung sein. Die Wirksamkeit einer Reduktion der Entstehung und Ausdifferenzierung der Zysten durch die Modulation des cAMP-Spiegels über den Vasopressin-Rezeptor wurde sowohl im Tiermodell als auch im Rahmen klinischer Studien im Menschen nachgewiesen^{26, 47, 50, 72}. Die Ergebnisse der morphometrischen Analyse der Nieren im Rahmen der vorliegenden Studie bekräftigen diese Hypothese.

MCF-264 blockiert den V2-Rezeptor agonistisch und aktiviert die Adenylatzyklase. Die Arbeitsgruppe um Wang bestätigte, dass die Adenylatzyklase über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels direkten Einfluss auf die Progression der Zystenbildung nimmt⁷¹. Auch in der vorliegenden Studie war eine Beschleunigung der zystischen Degeneration trotz fehlender Effekte auf die Urinausscheidung nach Behandlung mit MCF-264 nachvollziehbar. Die Nieren nahmen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an Gewicht zu. Überraschenderweise waren weder die zystischen noch die fibrotischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ausgeprägt. Es ist jedoch zu beachten, dass die Therapiestudie für die Mäuse der Verumgruppe MCF-264 2 Wochen vor der Kontrollgruppe aufgrund eines reduzierten Allgemeinbefindens der Tiere beendet werden musste. Daher konnte die Ausprägung der Zystenformation und der Kollageneinlagerung nicht abschließend beurteilt werden. Dagegen zeigte der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist OPC-31260 eine deutlich erkennbare protektive Wirkung auf die Niere. Das Nierengewicht, die Fläche, Anzahl und Größe der Zysten sowie die fibrotischen Veränderungen waren signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Die in der vorliegenden Studie generierten Ergebnisse für OPC-31260 decken sich mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft. Untersuchungen in Tiermodellen der ARPKD, Nephronophthase und ADPKD zeigten, dass eine Behandlung mit OPC-31260 nicht nur das Fortschreiten der Erkrankung stark eingrenzt, sondern darüber hinaus auch zu ihrer Regression führt^{26, 47}.

Ferner konnte nachgewiesen werden, dass OPC-31260 die renale Akkumulation von cAMP reduziert und die vermehrte Ausschüttung von Vasopressin sowie die Überexpression des V2-Rezeptors korrigiert^{26, 47}. Auch Tolvaptan, ein Derivat des OPC-31260, ist ein potenter V2-selektiver oral effektiver und nicht-peptidischer Vasopressin-Rezeptor-Antagonist, der im Tiermodell eine Erhöhung des Urinvolumens mit gleichzeitiger Erniedrigung der Urinosmolalität, eine Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels sowie der Expression von Aquaporin-2 bewirkte^{79, 80}. In einem Langzeitversuch über 5 Monate konnte gezeigt werden, dass Tolvaptan das Überleben der Versuchstiere gegenüber der Kontrolltiere verlängerte. Darüber hinaus konnte das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt und das Erreichen einer terminalen Niereninsuffizienz deutlich hinausgezögert werden⁸¹. In klinischen Studien löste Tolvaptan, analog zu den im Tiermodell gewonnenen Ergebnissen, beim Menschen eine Diurese aus. Ferner führte es zu einem reduzierten Auftreten von Biomarkern im Urin, die im Zusammenhang mit dem Verlust funktionsfähiger Nephrone vermehrt ausgeschieden werden⁸². In einer groß angelegten Studie mit Patienten der ADPKD konnte Tolvaptan nach dreijähriger Behandlung ein protektiver Effekt auf die humane Niere nachgewiesen werden, der sich in einer verlangsamen Zunahme des Nierengewichts und in einem verringerten Rückgang der Nierenfunktion widerspiegelte⁵⁰. Jedoch wurden neben unerwünschter Wirkungen wie Polydipsie und Polyurie auch eine ernstzunehmende Erhöhung der Leberenzyme beobachtet, die zu einer schlechten Akzeptanz der Behandlung durch die Patienten führten⁸³. Die Anwendung von Tolvaptan in der Humanmedizin zur Behandlung der PKD scheint vielversprechend zu sein, bedarf aber einer Überprüfung des Auftretens unerwünschter Wirkungen⁸⁴.

Der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 wurde im Rahmen der vorliegenden Studie zum ersten Mal in einem *in vivo* Modell getestet. Vorangegangene Untersuchungen in der Zellkultur zeigten, dass Mambaquaretin-1 mit hoher Affinität an den V2-Rezeptor bindet und die V1-Subtypen des Vasopressin-Rezeptors auch bei steigender Konzentration nicht beeinflusst. Darüber hinaus blockierte Mambaquaretin-1 die Signalkaskade am V2-Rezeptor auch nach Zugabe von Vasopressin vollständig (Nicolas Gilles, CEA, iBiTec-S, SIMOPRO, Gif sur Yvette, Frankreich, unveröffentlichte Daten). In der CD1^{pcy/pcy} Maus konnte Mambaquaretin-1 eine Wirksamkeit gegen die Progression der PKD zugeordnet werden. Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft existieren bisher weder *in vitro* noch *in vivo* Untersuchungen zu Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten aus der Gruppe der Dendrotoxine. Die vorliegende Studie ist die erste Studie zur Analyse der Dendrotoxine hinsichtlich ihrer Effekte auf die Zystenformation in einem Tiermodell der PKD und zeigte zur Signifikanz tendierende geringere Nierengewichte und eine signifikante Reduktion der zystischen Veränderungen im Nierenparenchym nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Diese Ergebnisse identifizieren Mambaquaretin-1 damit erstmalig als Therapiemöglichkeit der PKD im Tiermodell.

- *Therapeutisches Potential von Mambaquaretin-1 in der Behandlung der humanen PKD*

Die der modernen Medizin zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten der PKD sind nach wie vor begrenzt: Die symptomatische Therapie der Begleiterscheinungen und auftretender Komplikationen stellen die einzige Möglichkeit zur Begleitung der Patienten im Verlauf der ADPKD dar. Bei Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz in einem Alter von 60 bis 70 Jahren stehen zur Behandlung nur die Dialyse und die Transplantation einer neuen Niere zur Verfügung^{14, 15}. Obwohl intensive Forschung in den letzten 20 Jahren fundierte Kenntnisse der Pathogenese der Zystenentstehung lieferte, mangelt es immernoch an einer kausalen Therapie der PKD.

Die Forschungsarbeiten zur Pathogenese der Zystenentstehung konnten verschiedene mögliche Angriffspunkte für eine kausale Therapie identifizieren. So führte der Nachweis einer Aktivität von mTOR (mammalian target of rapamycin) im Zystenepithel im Tiermodell und im Menschen zu Studien in verschiedenen Tiermodellen der PKD⁸⁵. Der Einsatz der mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus reduzierte die Zystenexpansion im Tiermodell signifikant und übte einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion aus^{86, 87}. In randomisierten klinischen Studien hingegen konnte die Wirksamkeit der mTOR-Inhibitoren nicht ausreichend belegt werden⁸⁸⁻⁹¹. Parallel dazu wurde Somatostatin aufgrund seiner wirksamen Inhibition der intrazellulären Akkumulation von cAMP in humanen Cholangiozyten und renalen Tubuluszellen als Therapiemöglichkeit der PKD untersucht⁹². Mehrere synthetische Somatostatin-Analoga, unter anderem Octreotid, sind in der Humanmedizin zur Behandlung der Akromegalie und neuroendokriner Tumore des Gastrointestinaltrakts zugelassen⁹³. In einer Studie konnte nach Behandlung der PCK Ratte mit dem stabilen Somatostatin-Analogen Octreotid eine Reduktion der Zystenexpansion in der Niere und in der Leber nachgewiesen werden⁹⁴. Untersuchungen in placebo-kontrollierten klinischen Studien ergaben eine Reduktion der Zystenformation in Leber und Niere, jedoch konnte keine Verbesserung der Nierenfunktion beobachtet werden⁹⁵⁻⁹⁸ und es traten bei mehreren Patienten behandlungsassoziierte Nebenwirkungen auf⁹⁹. Ungeachtet dessen beschrieben die Patienten positive Effekte der Behandlung mit Octreotid auf ihre Lebensqualität⁹⁸. Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Zystenbildung ist die bereits beschriebene Modulation des cAMP-Spiegels über den renalen Vasopressin-Rezeptor V2. Die Hypothese, dass über eine Blockade des V2-Rezeptors der intrazelluläre cAMP-Spiegel gesenkt und sein fördernder Einfluss auf die Zystenbildung reduziert werden kann, wurde in Tiermodellen der ARPKD, der ADPKD und der Nephronophthise nachgewiesen^{26, 47, 64}. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Tolvaptan die Progression der PKD im Patienten deutlich hemmt^{50, 72, 82, 100}. Allerdings verschlechterte sich die Erkrankung nach Absetzen der Medikation wieder, so dass eine Langzeittherapie von Nöten ist. Diese steht in Konflikt mit einer schlechten Akzeptanz der Behandlung und dem Auftreten unerwünschter Wirkungen^{50, 72, 82, 100}. Ferner ist eine Behandlung mit Tolvaptan sehr kostenintensiv und stellt so keine Option für einen Langzeiteinsatz dar⁹³.

Der in der vorliegenden Studie untersuchte neue Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 blockierte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den V2-Rezeptor selektiv und mit hoher Affinität. Die nach den Ergebnisse der Zellkulturexperimente aufgestellte Hypothese, dass Mambaquaretin-1 über die Blockade des V2-Rezeptors einen protektiven Effekt auf die Niere ausübt, konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt werden. Es wurde eine Reduktion der Zystenformation nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 in einem *in vivo* Modell der PKD nachgewiesen. Die Behandlung wurde von den Versuchstieren gut toleriert und es traten über den Studienzeitraum von 100 Tagen keine unerwünschten Wirkungen auf. Im Kontext der beschränkten klinischen Möglichkeiten zur Therapie der humanen PKD und des Scheiterns einiger vielversprechender Behandlungsmöglichkeiten ist das therapeutische Potential von Mambaquaretin-1 von besonderer Bedeutung. Möglicherweise bietet Mambaquaretin-1 durch die Zugehörigkeit zu einer anderen Stoffklasse (Gruppe der Dendrotoxine) als bisher untersuchte Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe der Vaptane) eine sinnvolle Alternative. Besonders zu beachten ist, dass das Auftreten unerwünschter Wirkungen unter einer Behandlung mit Mambaquaretin-1 nach dem aktuellen Wissenstand als gering einzuschätzen ist. Die hohe Affinität von Mambaquaretin-1 für den V2-Rezeptor, seine fehlende Bindung an andere Subtypen des Vasopressin-Rezeptors und andere Rezeptoren der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie *in vitro* und die effektive Blockade des V2-Rezeptors durch Mambaquaretin-1 *in vivo* bieten die Möglichkeit einer Dosisreduzierung bei erhaltener Wirksamkeit in Korrelation mit seltener auftretenden Nebenwirkungen. Darüber hinaus ist Mambaquaretin-1 als Peptid wasserlöslich, so dass keine Lösungsmittel mit eventuell toxischen Wirkungen zur Einnahme verwendet werden müssen. Die Wahl des Applikationswegs ist jedoch eingeschränkt, da die orale Gabe eines Peptids ohne Maßnahmen zum Schutz vor den Verdauungsenzymen nicht möglich ist.

Mit dem Nachweis eines therapeutischen Potentials gegen die PKD ergeben sich einige Fragen, die durch weitere Studien zu Mambaquaretin-1 in der Zellkultur und im Tiermodell geklärt werden sollten. Es ist davon auszugehen, dass die Blockade des V2-Rezeptors durch Mambaquaretin-1 den intrazellulären cAMP-Spiegel reduziert. Diese Hypothese sollte durch Messung des renalen cAMP-Spiegels und durch weitere Untersuchungen der Signalkaskade am V2-Rezeptor nach Bindung von Mambaquaretin-1 überprüft werden. Neben diesem Aspekt sind auch die Folgen der durch Mambaquaretin-1 bedingten Diurese von Interesse. Es gilt zu überprüfen, ob die Diurese neben einer Polydipsie im Verlauf auch eine Dehydratation bewirkt. Diese wäre als Einschränkung der Lebensqualität zu beurteilen und könnte die Anwendungsmöglichkeiten von Mambaquaretin-1 begrenzen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

THERAPIESTUDIE ZUR WIRKUNG EINES VASOPRESSIN-REZEPTOR-AGONISTEN UND ZWEIER ANTAGONISTEN AN EINEM MAUSMODELL DER POLYZYSTISCHEN NIERENERKRANKUNG

In der Humanmedizin gibt es aktuell für Patienten, die an polyzystischer Nierenerkrankung (PKD) leiden, nur sehr begrenzte Therapiemöglichkeiten. Das medikamentöse Management auftretender Begleitscheinungen sowie bei Erreichen des Stadiums der terminalen Niereninsuffizienz die Dialyse und die Transplantation einer neuen Niere stehen für eine Behandlung zur Verfügung. Diese Optionen bieten jedoch nur ein Management der Symptome und stellen keine kausale Therapie der Grunderkrankung dar. Dies ist vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) die am häufigsten auftretende hereditäre Erkrankung beim Menschen ist, ein nicht tragbarer Zustand. Dringend notwendig ist die Entwicklung einer kausalen Therapie, die eine Progression des Zystenwachstums verhindert und idealerweise zu einer Regression der Erkrankung führt.

Die Mechanismen, die zum Auftreten der PKD führen, sind nicht gänzlich verstanden, aber es konnten einige Wege identifiziert werden über die eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention besteht. Aus aktuellen Studien ergeben sich vermehrt Hinweise, dass der Vasopressin-Rezeptor V2 einen vielversprechenden Angriffspunkt bietet. Er ist in der Niere vor allem im distalen Tubulus und im Sammelrohr lokalisiert, dort wo auch die im Verlauf der PKD entstehenden Zysten am stärksten ausgeprägt sind. Der physiologische Agonist des V2-Rezeptors ist Vasopressin, der durch seine Bindung eine Signalkaskade in Gang bringt, die zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch die Adenylatzyklase führt. Es konnte nachgewiesen werden, dass zystisch veränderte Nieren einen hohen cAMP-Spiegel aufweisen, welcher die Proliferation der Tubulusepithelzellen sowie die Flüssigkeitssekretion in das Zystenlumen begünstigt.

In der vorliegenden Studie wurde die Idee verfolgt, dass die Ausprägung der Zysten durch eine Modulation des cAMP-Spiegels beeinflusst werden kann. Hierzu wurden verschiedene Substanzen, die agonistisch (MCF-264) oder antagonistisch (OPC-31260 und Mambaquaretin-1) an den V2-Rezeptor binden, in einem Mausmodell (CD1^{pcy/pcy} Maus) der PKD untersucht. Darüber hinaus sollte der neue Vasopressin-Rezeptor-Antagonist Mambaquaretin-1 nach vielversprechenden *in vitro* Ergebnissen erstmalig in einem *in vivo* Modell untersucht werden. Um ein möglichst umfassendes Bild der Effekte zu erhalten, wurden neben der Veränderungen des Nierenparenchyms über die Histologie auch die Nierenfunktionsparameter in Urin und Blutplasma sowie Volumen, Osmolalität und Elektrolytkonzentration im Urin untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die PKD trotz der mit Hilfe der morphometrischen Analysen der Nieren detektierte umfassende zystische Degeneration im Rahmen des Studienzeitraum von 14 Wochen keine klinisch sichtbare Einschränkung der Nierenfunktion der CD1^{pcy/pcy} Mäuse bewirkte. Eine Stimulation des V2-Rezeptors durch den Vasopressin-Rezeptor-Agonisten MCF-264 beschleunigte die Progression der PKD. Dagegen konnten durch eine Blockade des V2-Rezeptors mit Hilfe des Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten OPC-31260 die zystischen und fibrotischen Veränderungen des Nierenparenchyms reduziert werden. Das Hauptziel der Studie war die erstmalige Untersuchung des Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten Mambaquaretin-1 in einem *in vivo* Modell der PKD. Mambaquaretin-1 wurde aus dem Gift der Blattgrünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) isoliert und als sehr potenter V2-selektiver kompetitiver Antagonist beschrieben. Im Rahmen dieser Studie konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Mambaquaretin-1 den V2-Rezeptor auch *in vivo* bereits in vergleichsweise geringer Dosierung sicher und ohne Gewöhnungseffekt über den gesamten Studienzeitraum von 100 Tagen blockiert. Darüber hinaus reduzierte Mambaquaretin-1 die Ausprägung der zystischen Veränderungen und übte damit einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion aus. Über den Studienzeitraum wurden keine unerwünschten Wirkungen beobachtet, die Mäuse tolerierten die Behandlung mit Mambaquaretin-1 gut und es gab keine Unterschiede in der körperlichen Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die Zystenformation direkt über die Modulation des intrazellulären cAMP-Spiegels über Stimulation oder Blockade des V2-Rezeptors beeinflusst werden kann. Mambaquaretin-1 konnte erstmalig ein hemmender Effekt auf die Progression der zystischen Degeneration der Niere zugewiesen werden und bietet möglicherweise eine Alternative für eine effektive kausale Therapie der PKD.

VII. SUMMARY

PILOT STUDY OF ONE VASOPRESSIN RECEPTOR AGONIST AND TWO ANTAGONISTS IN A MOUSE MODEL OF POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE

Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is one of the most common hereditary diseases in humans. Recent therapeutic strategies are largely limited to regular clinical controls and the management of complications of ADPKD. When reaching end-stage renal disease, hemodialysis and renal transplantation are the only possible therapeutic options. However, an effective treatment to slow down disease progression has yet to be established.

Although the mechanisms leading to cyst formation and growth remain poorly defined potential targets for therapeutic intervention have been identified. In this respect, previous reports indicate that the vasopressin receptor V2 represents one of the most promising candidates. It is exclusively located in renal distal tubules and collecting ducts which are the main sites of cyst formation. Mechanistically, vasopressin acts on the V2 receptor and activates adenylyl cyclase thereby leading to an increased cAMP level. In polycystic kidneys intracellular cAMP is elevated which stimulates cell proliferation in renal cysts and induces fluid secretion into the cyst lumen.

In our experimental study we could provide additional evidence for the hypothesis that controlling cyst formation by modulation of renal cAMP levels limits the progression of PKD. We explored three agents that act either as V2 receptor agonist (MCF-264) or as V2 receptor antagonist (OPC-31260 and mambaquaretin-1) in a mouse model of human PKD (CD1^{pcy/pcy} mouse). Mambaquaretin-1 was discovered in the green mamba's venom (*Dendroaspis angusticeps*) and was identified as a highly potent competitive antagonist selective for the V2 receptor. As shown in *in vitro* studies, mambaquaretin-1 represented a promising molecule for a therapeutic study in the mouse model of PKD. Therefore, histomorphometric analysis of renal tissue sections, serum creatinine and urea nitrogen levels as well as daily urine output, urine osmolality, total urinary electrolyte concentration, urine creatinine and urea nitrogen levels were determined.

No detectable decline of renal function of CD1^{pcy/pcy} mice was found within 14 weeks. Administration of the vasopressin receptor agonist MCF-264 led to increased kidney weights, whereas the vasopressin receptor antagonist OPC-31260 inhibited the progression of PKD. Our study showed for the first time that the specific inhibition of the V2 receptor by mambaquaretin-1 slows down cyst formation and protects renal function over the entire follow-up period of 100 days in a mouse model of PKD. Therefore mambaquaretin-1 represents a promising lead substance to develop new therapeutic approaches against progression of human PKD.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ko, J.Y. & Park, J.H. Mouse models of polycystic kidney disease induced by defects of ciliary proteins. *BMB. Rep.* **46**, 73-79 (2013).
2. Lieberthal, W. & Levine, J.S. Mammalian target of rapamycin and the kidney. II. Pathophysiology and therapeutic implications. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **303**, F180-F191 (2012).
3. Habbig, S. & Liebau, M.C. Ciliopathies - from rare inherited cystic kidney diseases to basic cellular function. *Mol. Cell Pediatr.* **2**, 8 (2015).
4. Lyons, L.A. *et al.* Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2548-2555 (2004).
5. Zerres, K. *et al.* Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am. J. Med. Genet.* **76**, 137-144 (1998).
6. Park, J.H. *et al.* A 1-Mb BAC/PAC-based physical map of the autosomal recessive polycystic kidney disease gene (PKHD1) region on chromosome 6. *Genomics* **57**, 249-255 (1999).
7. Ward, C.J. *et al.* The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat. Genet.* **30**, 259-269 (2002).
8. Guay-Woodford, L.M. & Desmond, R.A. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics* **111**, 1072-1080 (2003).
9. Menezes, L.F. *et al.* Polyductin, the PKHD1 gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm. *Kidney Int.* **66**, 1345-1355 (2004).
10. Blyth, H. & Ockenden, B.G. Polycystic disease of kidney and liver presenting in childhood. *J. Med. Genet.* **8**, 257-284 (1971).
11. Gunay-Aygun, M. *et al.* Autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis: summary statement of a first National Institutes of Health/Office of Rare Diseases conference. *J. Pediatr.* **149**, 159-164 (2006).
12. Guay-Woodford, L.M. *et al.* The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosome 6p21.1-p12: implications for genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 1101-1107 (1995).
13. Igarashi, P. & Somlo, S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 2384-2398 (2002).
14. Hateboer, N. *et al.* Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* **353**, 103-107 (1999).
15. Harris, P.C. & Torres, V.E. Polycystic Kidney Disease, Autosomal Dominant. (1993).

16. Grantham,J.J., Chapman,A.B., & Torres,V.E. Volume progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **1**, 148-157 (2006).
17. Torres,V.E. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* **34**, xlv-xlvi (1999).
18. Chapman,A.B. *et al.* Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **327**, 916-920 (1992).
19. Yoder,B.K., Mulroy,S., Eustace,H., Boucher,C., & Sandford,R. Molecular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Expert. Rev. Mol. Med.* **8**, 1-22 (2006).
20. Torra,R. *et al.* Increased prevalence of polycystic kidney disease type 2 among elderly polycystic patients. *Am. J. Kidney Dis.* **36**, 728-734 (2000).
21. Boletta,A. *et al.* Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol. Cell* **6**, 1267-1273 (2000).
22. Nauli,S.M. *et al.* Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* **33**, 129-137 (2003).
23. Yoder,B.K., Hou,X., & Guay-Woodford,L.M. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 2508-2516 (2002).
24. Geng,L. *et al.* Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J. Clin. Invest* **98**, 2674-2682 (1996).
25. Gonzalez-Perrett,S. *et al.* Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 1182-1187 (2001).
26. Gattone,V.H., Wang,X., Harris,P.C., & Torres,V.E. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat. Med.* **9**, 1323-1326 (2003).
27. McGrath,J., Somlo,S., Makova,S., Tian,X., & Brueckner,M. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* **114**, 61-73 (2003).
28. Pazour,G.J., San Agustin,J.T., Follit,J.A., Rosenbaum,J.L., & Witman,G.B. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr. Biol.* **12**, R378-R380 (2002).
29. Barthez,P.Y., Rivier,P., & Begon,D. Prevalence of polycystic kidney disease in Persian and Persian related cats in France. *J. Feline. Med. Surg.* **5**, 345-347 (2003).
30. Bonazzi,M. *et al.* Comparison between ultrasound and genetic testing for the early diagnosis of polycystic kidney disease in Persian and Exotic Shorthair cats. *J. Feline. Med. Surg.* **11**, 430-434 (2009).
31. Eaton,K.A., Biller,D.S., DiBartola,S.P., Radin,M.J., & Wellman,M.L. Autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian and Persian-cross cats. *Vet. Pathol.* **34**, 117-126 (1997).

32. Fliegauf,M., Benzing,T., & Omran,H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 880-893 (2007).
33. Berbari,N.F., O'Connor,A.K., Haycraft,C.J., & Yoder,B.K. The primary cilium as a complex signaling center. *Curr. Biol.* **19**, R526-R535 (2009).
34. Bhunia,A.K. *et al.* PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* **109**, 157-168 (2002).
35. Yamaguchi,T., Nagao,S., Kasahara,M., Takahashi,H., & Grantham,J.J. Renal accumulation and excretion of cyclic adenosine monophosphate in a murine model of slowly progressive polycystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* **30**, 703-709 (1997).
36. Danielsen,H. *et al.* Expansion of extracellular volume in early polycystic kidney disease. *Acta Med. Scand.* **219**, 399-405 (1986).
37. Devuyst,O. & Torres,V.E. Osmoregulation, vasopressin, and cAMP signaling in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **22**, 459-470 (2013).
38. Yamaguchi,T. *et al.* cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int.* **57**, 1460-1471 (2000).
39. Nadasdy,T. *et al.* Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 1462-1468 (1995).
40. Torres,V.E., Harris,P.C., & Pirson,Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* **369**, 1287-1301 (2007).
41. Mangoo-Karim,R. *et al.* Renal epithelial fluid secretion and cyst growth: the role of cyclic AMP. *FASEB J.* **3**, 2629-2632 (1989).
42. Grantham,J.J., Geiser,J.L., & Evan,A.P. Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* **31**, 1145-1152 (1987).
43. Patel,V., Chowdhury,R., & Igarashi,P. Advances in the pathogenesis and treatment of polycystic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **18**, 99-106 (2009).
44. Greenberg,A. & Verbalis,J.G. Vasopressin receptor antagonists. *Kidney Int.* **69**, 2124-2130 (2006).
45. Yasuda,G. & Jeffries,W.B. Regulation of cAMP production in initial and terminal inner medullary collecting ducts. *Kidney Int.* **54**, 80-86 (1998).
46. Mutig,K. *et al.* Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **293**, F1166-F1177 (2007).
47. Torres,V.E. *et al.* Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat. Med.* **10**, 363-364 (2004).

48. Gattone,V.H., Maser,R.L., Tian,C., Rosenberg,J.M., & Branden,M.G. Developmental expression of urine concentration-associated genes and their altered expression in murine infantile-type polycystic kidney disease. *Dev. Genet.* **24**, 309-318 (1999).
49. Wang,X., Gattone,V., Harris,P.C., & Torres,V.E. Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 846-851 (2005).
50. Torres,V.E. *et al.* Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2407-2418 (2012).
51. Boertien,W.E. *et al.* Short-term Effects of Tolvaptan in Individuals With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease at Various Levels of Kidney Function. *Am. J. Kidney Dis.*(2015).
52. Wallace,D.P. Cyclic AMP-mediated cyst expansion. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 1291-1300 (2011).
53. Grantham,J.J. Lillian Jean Kaplan International Prize for advancement in the understanding of polycystic kidney disease. Understanding polycystic kidney disease: a systems biology approach. *Kidney Int.* **64**, 1157-1162 (2003).
54. Gattone,V.H., Wang,X., Harris,P.C., & Torres,V.E. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat. Med.* **9**, 1323-1326 (2003).
55. Wang,X., Gattone,V., Harris,P.C., & Torres,V.E. Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 846-851 (2005).
56. Yamamura,Y. *et al.* Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 787-791 (1992).
57. Takahashi,H. *et al.* A hereditary model of slowly progressive polycystic kidney disease in the mouse. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1**, 980-989 (1991).
58. Nagao,S., Kugita,M., Yoshihara,D., & Yamaguchi,T. Animal models for human polycystic kidney disease. *Exp. Anim* **61**, 477-488 (2012).
59. Torres,V.E., Cowley,B.D., Jr., Branden,M.G., Yoshida,I., & Gattone,V.H. Long-term ammonium chloride or sodium bicarbonate treatment in two models of polycystic kidney disease. *Exp. Nephrol.* **9**, 171-180 (2001).
60. Berndt,K.D., Guntert,P., & Wuthrich,K. Nuclear magnetic resonance solution structure of dendrotoxin K from the venom of *Dendroaspis polylepsis polylepsis*. *J. Mol. Biol.* **234**, 735-750 (1993).
61. Schmidt,K. *et al.* Dynamics of renal electrolyte excretion in growing mice. *Nephron Physiol* **124**, 7-13 (2013).
62. Schneider,C.A., Rasband,W.S., & Eliceiri,K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671-675 (2012).
63. Lakens,D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front Psychol.* **4**, 863 (2013).

64. Meijer,E. *et al.* Therapeutic potential of vasopressin V2 receptor antagonist in a mouse model for autosomal dominant polycystic kidney disease: optimal timing and dosing of the drug. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 2445-2453 (2011).
65. Grantham,J.J. *et al.* Volume progression in polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2122-2130 (2006).
66. Mochizuki,T. *et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* **272**, 1339-1342 (1996).
67. Pazour,G.J. & Rosenbaum,J.L. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol.* **12**, 551-555 (2002).
68. Qian,F., Watnick,T.J., Onuchic,L.F., & Germino,G.G. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* **87**, 979-987 (1996).
69. Harris,P.C. What is the role of somatic mutation in autosomal dominant polycystic kidney disease? *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1073-1076 (2010).
70. Pei,Y. A "two-hit" model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease? *Trends Mol. Med.* **7**, 151-156 (2001).
71. Wang,X., Wu,Y., Ward,C.J., Harris,P.C., & Torres,V.E. Vasopressin directly regulates cyst growth in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 102-108 (2008).
72. Higashihara,E. *et al.* Tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: three years' experience. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **6**, 2499-2507 (2011).
73. Aukema,H.M. *et al.* Alterations in renal cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenases in polycystic kidney disease. *FASEB J.* **17**, 298-300 (2003).
74. Cuzzo,F.P., Mishra,S., Jiang,J., & Aukema,H.M. Overexpression of kidney phosphatidylinositol 4-kinase β and phospholipase C(γ 1) proteins in two rodent models of polycystic kidney disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1587**, 99-106 (2002).
75. Broom,D.M. Assessing welfare and suffering. *Behav. Processes* **25**, 117-123 (1991).
76. Martinez-Maldonado,M., Yium,J.J., Eknoyan,G., & Suki,W.N. Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int.* **2**, 107-113 (1972).
77. Zittema,D. *et al.* Vasopressin, copeptin, and renal concentrating capacity in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease without renal impairment. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 906-913 (2012).
78. Torres,V.E. Cyclic AMP, at the hub of the cystic cycle. *Kidney Int.* **66**, 1283-1285 (2004).
79. Kondo,K. *et al.* Characterization of orally active nonpeptide vasopressin V(2) receptor agonist. Synthesis and biological evaluation of both the (5R)- and (5S)-enantiomers of 2-[1-(2-Chloro-4-pyrrolidin-1-yl-benzoyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin- 5-yl]-N-isopropylacetamide. *J. Med. Chem.* **45**, 3805-3808 (2002).

80. Hirano,T., Yamamura,Y., Nakamura,S., Onogawa,T., & Mori,T. Effects of the V(2)-receptor antagonist OPC-41061 and the loop diuretic furosemide alone and in combination in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 288-294 (2000).
81. Aihara,M. *et al.* Tolvaptan delays the onset of end-stage renal disease in a polycystic kidney disease model by suppressing increases in kidney volume and renal injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **349**, 258-267 (2014).
82. Irazabal,M.V. *et al.* Short-term effects of tolvaptan on renal function and volume in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* **80**, 295-301 (2011).
83. Ohnishi,A. *et al.* Aquaretic effect of a potent, orally active, nonpeptide V2 antagonist in men. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**, 546-551 (1995).
84. Torres,V.E. *et al.* Effect of Tolvaptan in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease by CKD Stage: Results from the TEMPO 3:4 Trial. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*(2016).
85. Shillingford,J.M. *et al.* The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 5466-5471 (2006).
86. Torres,V.E. *et al.* Prospects for mTOR inhibitor use in patients with polycystic kidney disease and hamartomatous diseases. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 1312-1329 (2010).
87. Wahl,P.R. *et al.* Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**, 598-604 (2006).
88. Stallone,G. *et al.* Rapamycin for treatment of type I autosomal dominant polycystic kidney disease (RAPYD-study): a randomized, controlled study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 3560-3567 (2012).
89. Serra,A.L. *et al.* Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **363**, 820-829 (2010).
90. Walz,G. *et al.* Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **363**, 830-840 (2010).
91. Perico,N. *et al.* Sirolimus therapy to halt the progression of ADPKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1031-1040 (2010).
92. Hogan,M.C. *et al.* Somatostatin analog therapy for severe polycystic liver disease: results after 2 years. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 3532-3539 (2012).
93. Wuthrich,R.P. & Mei,C. Pharmacological management of polycystic kidney disease. *Expert. Opin. Pharmacother.* **15**, 1085-1095 (2014).
94. Masyuk,T.V., Masyuk,A.I., Torres,V.E., Harris,P.C., & LaRusso,N.F. Octreotide inhibits hepatic cystogenesis in a rodent model of polycystic liver disease by reducing cholangiocyte adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Gastroenterology* **132**, 1104-1116 (2007).
95. Ruggenenti,P. *et al.* Safety and efficacy of long-acting somatostatin treatment in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* **68**, 206-216 (2005).

96. Caroli,A. *et al.* Reducing polycystic liver volume in ADPKD: effects of somatostatin analogue octreotide. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 783-789 (2010).
97. van,K.L. *et al.* Lanreotide reduces the volume of polycystic liver: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **137**, 1661-1668 (2009).
98. Hogan,M.C. *et al.* Randomized clinical trial of long-acting somatostatin for autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1052-1061 (2010).
99. Caroli,A. *et al.* Effect of longacting somatostatin analogue on kidney and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN): a randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* **382**, 1485-1495 (2013).
100. Boertien,W.E. *et al.* Short-term renal hemodynamic effects of tolvaptan in subjects with autosomal dominant polycystic kidney disease at various stages of chronic kidney disease. *Kidney Int.* **84**, 1278-1286 (2013).

Verwendete Lehrbücher

- Georg Löffler, Petro Petrides: Biochemie und Pathobiochemie, Springer Medizin Verlag, Berlin, 7.Auflage 2003, ISBN 3-540-42295-1
- Richard Nickel, August Schummer, Eugen Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Parey Verlag, Stuttgart, Band 2 – Eingeweide, 9. Auflage 2004, ISBN 3-8304-4152-5
- Robert F. Schmidt, Florian Lang: Physiologie des Menschen, Springer Medizin Verlag, Berlin, 30. Auflage 2007, ISBN 978-3-540-32908-4

IX. ANHANG

Im Folgenden sind die erhobenen Daten tabellarisch präsentiert.

TABELLE 11: Absolutes Körpergewicht [g]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen im Verlauf der Therapiestudie.

	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	20,2 \pm 1,4	23,0 \pm 1,4	21,9 \pm 2,4	21,2 \pm 2,9
OPC-31260	18,9 \pm 1,0	20,2 \pm 0,7	20,5 \pm 1,5	20,0 \pm 1,4
Kontrolle (4% DMSO)	20,2 \pm 1,0	21,5 \pm 1,0	21,5 \pm 1,8	20,9 \pm 1,6
Mambaquaretin-1	19,3 \pm 1,4	21,0 \pm 1,3	21,6 \pm 1,8	21,1 \pm 2,2
Kontrolle (0,9 % NaCl)	18,6 \pm 0,9	20,8 \pm 0,5	21,4 \pm 0,6	21,3 \pm 0,8

TABELLE 12: Absolutes Urinvolumen [μ l/24 Stunden]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen im Verlauf der Therapiestudie. Für die Gruppe MCF-264 konnte für Tag 70 aus technischen Gründen kein Urin gewonnen werden.

	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	1077,8 \pm 579,2	1133,3 \pm 540,6	—	2041,7 \pm 948,9
OPC-31260	692,9 \pm 180,6	821,4 \pm 548,9	921,4 \pm 686,5	950,0 \pm 751,2
Kontrolle (4 % DMSO)	935,6 \pm 469,6	1342,9 \pm 945,1	1885,7 \pm 1233,4	1785,7 \pm 1117,9
Mambaquaretin-1	709,5 \pm 291,0	4028,6 \pm 879,5	3371,4 \pm 954,3	4216,7 \pm 916,8
Kontrolle (0,9 % NaCl)	1076,2 \pm 383,0	1328,6 \pm 465,1	1450,0 \pm 1486,9	1792,9 \pm 384,0

TABELLE 13: Relatives Urinvolumen [$\mu\text{l/g}$ Körpergewicht in 24 Stunden]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen im Verlauf der Therapiestudie. Für die Gruppe MCF-264 konnte für Tag 70 aus technischen Gründen kein Urin gewonnen werden.

	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	53,3 \pm 28,0	49,2 \pm 22,2	—	98,9 \pm 47,0
OPC-31260	36,7 \pm 9,5	40,7 \pm 27,3	47,5 \pm 38,0	49,1 \pm 40,8
Kontrolle (4 % DMSO)	46,9 \pm 25,1	63,0 \pm 46,1	89,0 \pm 58,7	86,5 \pm 53,9
Mambaquaretin-1	37,3 \pm 16,0	192,8 \pm 45,7	159,5 \pm 54,9	202,4 \pm 47,4
Kontrolle (0,9 % NaCl)	58,0 \pm 21,2	64,2 \pm 23,6	68,2 \pm 70,0	84,3 \pm 18,0

TABELLE 14: Urinosmolalität [mosmol/kg]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen im Verlauf der Therapiestudie. Für die Gruppe MCF-264 konnte für Tag 70 aus technischen Gründen kein Urin gewonnen werden.

	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	1106,3 \pm 129,2	954,7 \pm 85,7	—	557,0 \pm 184,2
OPC-31260	1285,3 \pm 177,9	1203,9 \pm 239,2	1137,9 \pm 558,7	1122,4 \pm 429,3
Kontrolle (4 % DMSO)	1080,3 \pm 320,3	986,1 \pm 431,3	616,1 \pm 201,3	558,9 \pm 164,2
Mambaquaretin-1	1089,3 \pm 118,2	297,3 \pm 56,8	436,9 \pm 92,6	368,7 \pm 71,6
Kontrolle (0,9 % NaCl)	1054,0 \pm 186,9	1012,3 \pm 199,9	862,0 \pm 212,2	899,3 \pm 219,1

TABELLE 15: Harnstoffkonzentration im Urin [mg/dl]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen im Verlauf der Therapiestudie. Für die Gruppe MCF-264 konnte für Tag 70 aus technischen Gründen kein Urin gewonnen werden.

	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	3711,9 \pm 395,5	3519,6 \pm 511,3	—	2073,0 \pm 526,3
OPC-31260	4978,8 \pm 966,8	3957,7 \pm 1706,2	4125,9 \pm 1899,3	3825,5 \pm 1385,4
Kontrolle (4 % DMSO)	3919,8 \pm 1450,9	3485,8 \pm 959,0	1972,3 \pm 722,1	1977,3 \pm 547,7
Mambaquaretin-1	4230,9 \pm 472,8	1059,7 \pm 221,9	1340,3 \pm 376,5	1606,4 \pm 228,6
Kontrolle (0,9 % NaCl)	4137,2 \pm 716,4	3733,2 \pm 856,7	3284,9 \pm 855,7	3225,6 \pm 654,7

TABELLE 16: Kreatininkonzentration im Urin [mg/dl]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen im Verlauf der Therapiestudie. Für die Gruppe MCF-264 konnte für Tag 70 aus technischen Gründen kein Urin gewonnen werden.

	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	20,7 \pm 5,4	24,0 \pm 6,0	—	8,7 \pm 5,7
OPC-31260	22,9 \pm 4,9	25,8 \pm 11,8	18,6 \pm 9,2	23,1 \pm 15,1
Kontrolle (4 % DMSO)	17,3 \pm 8,0	21,1 \pm 19,6	9,7 \pm 6,1	9,7 \pm 7,7
Mambaquaretin-1	21,8 \pm 4,2	6,9 \pm 2,3	9,9 \pm 3,5	7,0 \pm 2,5
Kontrolle (0,9 % NaCl)	23,6 \pm 8,0	24,0 \pm 9,3	19,2 \pm 7,1	14,3 \pm 6,5

TABELLE 17: Gesamtprotein im Urin [g/ml]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen im Verlauf der Therapiestudie. Für die Gruppe MCF-264 konnte für Tag 70 aus technischen Gründen kein Urin gewonnen werden.

	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	6,7 \pm 1,5	4,9 \pm 2,4	—	2,7 \pm 0,9
OPC-31260	6,5 \pm 1,1	5,4 \pm 2,5	5,5 \pm 3,2	5,4 \pm 2,9
Kontrolle (4 % DMSO)	5,8 \pm 2,1	4,1 \pm 2,5	2,7 \pm 1,1	2,2 \pm 0,7
Mambaquaretin-1	5,9 \pm 1,1	1,2 \pm 0,5	1,5 \pm 1,2	1,5 \pm 0,7
Kontrolle (0,9 % NaCl)	5,5 \pm 1,9	6,4 \pm 3,5	3,9 \pm 1,0	4,5 \pm 2,4

TABELLE 18: Konzentration der Kationen und Anionen im Urin [mmol/l]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen im Verlauf der Therapiestudie. Für die Gruppe MCF-264 konnte für Tag 70 aus technischen Gründen kein Urin gewonnen werden.

Kationen	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	367,0 \pm 71,6	244,3 \pm 47,2	—	144,9 \pm 30,5
OPC-31260	271,6 \pm 27,9	247,4 \pm 119,8	269,0 \pm 120,3	214,5 \pm 59,8
Kontrolle (4 % DMSO)	346,4 \pm 71,2	213,2 \pm 20,0	140,5 \pm 37,4	138,6 \pm 42,5
Mambaquaretin-1	266,6 \pm 32,6	47,9 \pm 7,8	121,1 \pm 45,5	72,9 \pm 19,7
Kontrolle (0,9 % NaCl)	263,8 \pm 70,0	232,8 \pm 47,9	197,2 \pm 56,5	207,3 \pm 58,0
Anionen	Tag 0	Tag 30	Tag 70	Tag 86/100
MCF-264	188,8 \pm 35,7	179,0 \pm 40,4	—	107,6 \pm 29,9
OPC-31260	187,7 \pm 29,7	203,9 \pm 102,3	197,5 \pm 94,3	164,4 \pm 49,1
Kontrolle (4 % DMSO)	205,1 \pm 57,0	163,3 \pm 15,1	99,2 \pm 27,1	101,1 \pm 38,8
Mambaquaretin-1	247,0 \pm 35,6	37,7 \pm 7,2	51,2 \pm 14,9	56,7 \pm 17,4
Kontrolle (0,9 % NaCl)	184,0 \pm 30,8	166,8 \pm 40,3	143,7 \pm 50,9	157,7 \pm 48,9

TABELLE 19: Absolutes [g] und relatives Nierengewicht [g/g]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen am Ende der Therapiestudie.

	Absolutes Nierengewicht	Ratio Nierengewicht/Körpergewicht	Ratio Nierengewicht/Herzgewicht
MCF-264	1,16 \pm 0,32	0,05 \pm 0,01	9,4 \pm 3,5
OPC-31260	0,52 \pm 0,11	0,03 \pm 0,01	4,2 \pm 0,8
Kontrolle (4 % DMSO)	0,86 \pm 0,18	0,04 \pm 0,01	8,0 \pm 2,6
Mambaquaretin-1	0,61 \pm 0,14	0,03 \pm 0,01	5,5 \pm 1,6
Kontrolle (0,9 % NaCl)	0,92 \pm 0,41	0,04 \pm 0,02	8,0 \pm 3,2

TABELLE 20: Übersicht der Daten der zystischen Veränderungen. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen am Ende der Therapiestudie.

	MCF-264	OPC-31260	Kontrolle (4 % DMSO)	MQ-1	Kontrolle (0,9 % NaCl)
Ratio Zysten/ Niere links	0,22 \pm 0,09	0,07 \pm 0,04	0,18 \pm 0,06	0,19 \pm 0,05	0,28 \pm 0,12
Ratio Zysten/ Nieren rechts	0,29 \pm 0,11	0,12 \pm 0,08	0,26 \pm 0,04	0,22 \pm 0,05	0,29 \pm 0,12
Ratio Zysten/ Nieren gesamt	0,26 \pm 0,06	0,09 \pm 0,06	0,23 \pm 0,02	0,21 \pm 0,03	0,29 \pm 0,09
Relative Zystenanzahl links	6,24 \pm 2,33	6,84 \pm 1,40	3,70 \pm 1,41	7,38 \pm 1,30	8,70 \pm 1,66
Relative Zystenanzahl rechts	7,52 \pm 1,84	6,44 \pm 1,18	5,49 \pm 1,98	7,89 \pm 1,05	8,61 \pm 1,53
Relative Zystenanzahl gesamt	7,01 \pm 1,36	6,72 \pm 0,50	4,61 \pm 1,60	7,70 \pm 0,40	8,74 \pm 0,90
Mittlere Zystengröße links [mm ²]	0,04 \pm 0,01	0,02 \pm 0,004	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,004	0,03 \pm 0,01
Mittlere Zystengröße rechts [mm ²]	0,04 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,04 \pm 0,004	0,03 \pm 0,005	0,03 \pm 0,01

TABELLE 21: Relative Fläche der Fibrose. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen am Ende der Therapiestudie.

	MCF-264	OPC-31260	Kontrolle (4 % DMSO)	MQ-1	Kontrolle (0,9 % NaCl)
Relative Fibrosefläche links	2,03 \pm 0,73	0,69 \pm 0,78	3,15 \pm 1,90	2,58 \pm 1,33	2,40 \pm 0,79
Relative Fibrosefläche rechts	2,79 \pm 0,89	1,86 \pm 1,69	2,65 \pm 1,04	2,36 \pm 0,67	2,76 \pm 1,71
Relative Fibrosefläche gesamt	2,34 \pm 0,74	1,22 \pm 0,99	2,83 \pm 1,22	2,45 \pm 0,76	2,57 \pm 1,03

TABELLE 22: Harnstoff- und Kreatininkonzentration im Blutplasma [mg/dl]. Angegeben sind die MW \pm SD aller Gruppen am Ende der Therapiestudie.

	MCF-264	OPC-31260	Kontrolle (4 % DMSO)	MQ-1	Kontrolle (0,9 % NaCl)
Harnstoff	104,7 \pm 19,8	60,1 \pm 9,3	79,1 \pm 15,1	73,1 \pm 6,6	75,9 \pm 11,1
Kreatinin	0,38 \pm 0,25	0,61 \pm 0,37	0,79 \pm 0,43	0,59 \pm 0,11	1,88 \pm 0,73

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung des Nierenparenchyms und des <i>Sinus renalis</i>	3
Abbildung 2: Vergleich einer polyzystischen Niere mit einer gesunden Niere	7
Abbildung 3: Intrazellulärer Signaltransduktionsweg am V1-Rezeptor.....	10
Abbildung 4: Signaltransduktionsweg am V2-Rezeptor in einer Epithelzelle des Sammelrohrs	11
Abbildung 5: Chemische Struktur von MCF-264	16
Abbildung 6: Chemische Struktur von OPC-31260.....	16
Abbildung 7: Quartärstruktur von Mambaquaretin-1.	17
Abbildung 8: Versuchsaufbau.....	18
Abbildung 9: Farbreaktion nach Pierce.....	21
Abbildung 10: Formel nach Cohen, modifiziert nach Hedges.....	26
Abbildung 11: Tägliche Urinproduktion nach Behandlung mit MCF-264 in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung.	28
Abbildung 12: Urinosmolalität nach Behandlung mit MCF-264 in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung	29
Abbildung 13: Tägliche Urinproduktion nach Behandlung mit OPC-31260 in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung.....	30
Abbildung 14: Urinosmolalität nach Behandlung mit OPC-31260 in Abhängigkeit von Applikationsart und Dosierung	30
Abbildung 15: Mambaquaretin-1 zeigte keinen Unterschied in Abhängigkeit von der Applikationsart im diuretischen Effekt auf die tägliche Urinproduktion	31
Abbildung 16: Diuretischer Effekt von Mambaquaretin-1 auf die tägliche Urinproduktion in Abhängigkeit von der Dosierung	32
Abbildung 17: Mambaquaretin-1 zeigte in Abhängigkeit vom Mausstamm keinen Unterschied im diuretischen Effekt auf die tägliche Urinproduktion	32
Abbildung 18: Mambaquaretin-1 zeigte in Abhängigkeit von der Applikationsart keinen Unterschied in seiner Wirkung auf die Urinosmolalität	33
Abbildung 19: Effekt von Mambaquaretin-1 auf die Urinosmolalität in Abhängigkeit von der Dosierung	33
Abbildung 20: Mambaquaretin-1 zeigte in Abhängigkeit vom Mausstamm keinen Unterschied in seiner Wirkung auf die Urinosmolalität	34
Abbildung 21: Physiologische Entwicklung des Körpergewichts der Verumgruppe MCF-264 über den Studienzeitraum.....	37
Abbildung 22: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die tägliche Urinproduktion über den Studienzeitraum.....	37
Abbildung 23: Entwicklung des Urinvolumens in 24 Stunden nach Bezug auf das Körpergewicht über den Studienzeitraum	38
Abbildung 24: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Urinosmolalität über den Studienzeitraum.....	38
Abbildung 25: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Kationenkonzentration im Urin über den Studienzeitraum.....	39
Abbildung 26: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Anionenkonzentration im Urin über den Studienzeitraum.....	39
Abbildung 27: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Harnstoffkonzentration im Urin über den Studienzeitraum	40

Abbildung 28: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Kreatininkonzentration im Urin über den Studienzeitraum	40
Abbildung 29: MCF-264 zeigte keinen Effekt auf die Proteinkonzentration im Urin über den Studienzeitraum	41
Abbildung 30: MCF-264 führte zu einer erhöhten Harnstoffkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie.....	41
Abbildung 31: MCF-264 führte zu einer Reduktion der Kreatininkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie	42
Abbildung 32: Physiologische Entwicklung des Körpergewichts der Verumgruppe OPC-31260 über den Studienzeitraum	43
Abbildung 33: OPC-31260 führte zu keinen Veränderungen der täglichen Urinproduktion über den Studienzeitraum	43
Abbildung 34: Entwicklung des Urinvolumens in 24 Stunden nach Bezug auf das Körpergewicht über den Studienzeitraum	44
Abbildung 35: OPC-31260 erhöhte die Urinosmolalität über den Studienzeitraum	44
Abbildung 36: OPC-31260 erhöhte die Kationenkonzentration im Urin über den Studienzeitraum.....	44
Abbildung 37: OPC-31260 erhöhte die Anionenkonzentration im Urin über den Studienzeitraum.....	45
Abbildung 38: OPC-31260 erhöhte die Harnstoffkonzentration im Urin über den Studienzeitraum.....	45
Abbildung 39: OPC-31260 erhöhte die Kreatininkonzentration im Urin über den Studienzeitraum.....	45
Abbildung 40: OPC-31260 erhöhte die Proteinkonzentration im Urin über den Studienzeitraum.....	46
Abbildung 41: OPC-31260 führte zu einer Reduktion der Harnstoffkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie	46
Abbildung 42: OPC-31260 führte zu keinen Veränderungen der Kreatininkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie	46
Abbildung 43: Physiologische Entwicklung des Körpergewichts der Verumgruppe Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum	48
Abbildung 44: Deutlicher diuretischer Effekt von Mambaquaretin-1 auf die tägliche Urinproduktion über den Studienzeitraum	48
Abbildung 45: Entwicklung des Urinvolumens in 24 Stunden nach Bezug auf das Körpergewicht über den Studienzeitraum	49
Abbildung 46: Reduktion der Urinosmolalität nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum	49
Abbildung 47: Reduktion der Kationenkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum	49
Abbildung 48: Reduktion der Anionenkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum	50
Abbildung 49: Reduktion der Harnstoffkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum	50
Abbildung 50: Reduktion der Kreatininkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum	50
Abbildung 51: Reduktion der Proteinkonzentration im Urin nach Behandlung mit Mambaquaretin-1 über den Studienzeitraum	51
Abbildung 52: Mambaquaretin-1 zeigte keine Wirkung auf die Harnstoffkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie	51

Abbildung 53: Mambaqueletin-1 führte zu einer deutlichen Reduktion der Kreatininkonzentration im Blutplasma am Ende der Therapiestudie.....	51
Abbildung 54: Erhöhtes absolutes Nierengewicht nach Behandlung mit MCF-264	53
Abbildung 55: Erhöhtes relatives Nierengewicht im Bezug auf das Körpergewicht nach Behandlung mit MCF-264	54
Abbildung 56: Relatives Nierengewicht im Bezug auf das Herzgewicht nach Behandlung mit MCF-264.....	54
Abbildung 57: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der zystischen Degeneration nach Behandlung mit MCF-264, HE gefärbt	55
Abbildung 58: Relative Zystenfläche nach Behandlung mit MCF-264	55
Abbildung 59: Unveränderte relative Anzahl der Zysten nach Behandlung mit MCF-264 ...	56
Abbildung 60: Nach Behandlung mit MCF-264 zeigten sich im Mittel vergrößerte Zysten in der linken Niere.....	56
Abbildung 61: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der fibrotischen Veränderungen nach Behandlung mit MCF-264, Sirius-Rot gefärbt	57
Abbildung 62: Unveränderte relative Fibrosefläche nach Behandlung mit MCF-264.....	57
Abbildung 63: OPC-31260 führte zu einer deutlichen Reduktion des absoluten Nierengewichts	58
Abbildung 64: Verringertes relatives Nierengewicht im Bezug auf das Körpergewicht nach Behandlung mit OPC-31260	59
Abbildung 65: Verringertes relatives Nierengewicht im Bezug auf das Herzgewicht nach Behandlung mit OPC-31260	59
Abbildung 66: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der reduzierten zystischen Degeneration nach Behandlung mit OPC-31260, HE gefärbt.....	60
Abbildung 67: OPC-31260 führte zu einer deutlichen Reduktion der relativen Zystenfläche ..	60
Abbildung 68: Reduzierte relative Anzahl der Zysten nach Behandlung mit OPC-31260	61
Abbildung 69: Nach Behandlung mit OPC-31260 war sowohl in der linken als auch in der rechten Niere die Zystengröße im Mittel vermindert	61
Abbildung 70: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der reduzierten fibrotischen Veränderungen nach Behandlung mit OPC-31260, Sirius-Rot gefärbt	62
Abbildung 71: Reduzierte relative Fibrosefläche nach Behandlung mit OPC-31260	62
Abbildung 72: Nach Behandlung mit Mambaqueletin-1 zeigte sich eine zur statistischen Signifikanz tendierende Reduktion des absoluten Nierengewichts.....	63
Abbildung 73: Nach Behandlung mit Mambaqueletin-1 zeigte sich ein zur statistischen Signifikanz tendierendes reduziertes relatives Nierengewicht im Bezug auf das Körpergewicht.....	64
Abbildung 74: Mambaqueletin-1 führte zu einer zur statistischen Signifikanz tendierenden Reduktion des relativen Nierengewichts im Bezug auf das Herzgewicht.....	64
Abbildung 75: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der reduzierten zystischen Degeneration nach Behandlung mit Mambaqueletin-1, HE gefärbt	65
Abbildung 76: Reduzierte relative Zystenfläche nach Behandlung mit Mambaqueletin-1 ...	65
Abbildung 77: Reduzierte relative Anzahl der Zysten nach Behandlung mit Mambaqueletin-1	66

Abbildung 78: Eine Behandlung mit Mambaquaretin-1 zeigte keinen Einfluss auf die mittlere Zystengröße.....	66
Abbildung 79: Repräsentative histologische Präparate im Querschnitt der Niere zur Darstellung der fibrotischen Veränderungen nach Behandlung mit Mambaquaretin-1, Sirius-Rot gefärbt.....	67
Abbildung 80: Eine Behandlung mit Mambaquaretin-1 zeigte keinen Einfluss auf die relative Fibrosefläche	67

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Subtypen des Vasopressin-Rezeptors	9
Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Therapiestudie	17
Tabelle 3: Versuch zur Dosisfindung	18
Tabelle 4: Standardprotokoll zur Vorbereitung histologischer Präparate	24
Tabelle 5: Standardprotokoll der HE-Färbung.....	24
Tabelle 6: Standardprotokoll der Sirius-Rot-Färbung.	25
Tabelle 7: Signifikanzen für das Urinvolumen nach sc-Applikation von Mambaquaretin-1	31
Tabelle 8: Signifikanzen für das Urinvolumen nach ip-Applikation von Mambaquaretin-1	32
Tabelle 9: Mambaquaretin-1, Signifikanzen für die Osmolalität nach ip-Applikation.....	33
Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse der Therapiestudie	70
Tabelle 11: Absolutes Körpergewicht [g].....	91
Tabelle 12: Absolutes Urinvolumen [μ l/24 Stunden].....	91
Tabelle 13: Relatives Urinvolumen [μ l/g Körpergewicht in 24 Stunden]	92
Tabelle 14: Urinosmolalität [mosmol/kg]	92
Tabelle 15: Harnstoffkonzentration im Urin [mg/dl]	92
Tabelle 16: Kreatininkonzentration im Urin [mg/dl]	93
Tabelle 17: Gesamtprotein im Urin [g/ml].....	93
Tabelle 18: Konzentration der Kationen und Anionen im Urin [mmol/l].....	94
Tabelle 19: Absolutes [g] und relatives Nierengewicht [g/g]	94
Tabelle 20: Übersicht der Daten der zystischen Veränderungen	95
Tabelle 21: Relative Fläche der Fibrose.....	95
Tabelle 22: Harnstoff- und Kreatininkonzentration im Blutplasma [mg/dl].....	95

XII. DANKSAGUNG

Allen voran danke ich meinem Doktorvater *Ralph Witzgall* für das interessante Thema und die Möglichkeit als Tiermedizinerin in der humanmedizinischen Forschung zu promovieren. Darüber hinaus möchte ich ihm für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Fragen zu meiner Doktorarbeit und dem Drumherum inklusive gesalzener Macadamia und „The BossHoss“ danken.

Des Weiteren danke ich *Nicolas Gilles*, *Christiane Mendre* und *Bernard Mouillac* für die Kooperation und für die Überlassung der Substanzen.

Rüdiger Wanke vom Lehrstuhl für Pathologie an der LMU München danke ich, dass ich über ihn meine Doktorarbeit in München einreichen durfte.

Sascha Bandulik vom Institut für Physiologie – Medizinische Zellbiologie an der Universität Regensburg danke ich für die Messung der Elektrolyte in den Urinproben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Witzgall danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in ihre Runde, das gute Arbeitsklima, das theoretische und praktische Wissen, das sie jederzeit mit mir teilten und die grenzenlose Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich *Marion Kubiza*, *Helga Othmen*, *Ton Maurer* und *Edeltraud Lautenschlager*. Danke, für eure Unterstützung! Ganz herzlich danke ich *Christine Maaßen*, die mir diese Doktorarbeit vermittelte. Danke, für die Einführung in die Histologie, für die Hilfe bei der Anfertigung meiner Präparate und danke für die Unterstützung jederzeit und in jeglicher Form.

Franz Wiesenmayer, ehemaliger Tierpfleger an der Universität Regensburg, danke ich für die Unterweisung im Umgang mit den Mäusen, für viele Tipps und Tricks und für den einen oder anderen kleinen Plausch.

Dem tierärztlichen Leiter der Zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg, *Thilo Spruss*, möchte ich für den regen Wissensaustausch, für sein offenes Ohr, für seine Unterstützung und sein Vertrauen zu Zeiten meiner Doktorarbeit und jetzt danken.

An *Sven Reese* vom Lehrstuhl für Anatomie an der LMU München geht ein herzliches Dankeschön für die Einführung in die unergründlichen Tiefen der Statistik und für seine Unterstützung.

Ein großer Dank geht an meine Arbeitskollegen am Universitätsklinikum Regensburg, die mich mit offenen Armen empfangen und sowohl in meinem neuen Aufgabenbereich als auch in der Fertigstellung meiner Dissertation tatkräftig unterstützt haben und weiterhin unterstützen. Danke *Brigitte Ruhland* für die Hilfe bei der Messung von Harnstoff, Kreatinin und Protein und vor allem danke für das immer offene Ohr für alle Fragen. Danke *Simone Wurm* für das wiederholte Korrekturlesen meiner Dissertation. Mein spezieller Dank geht an *Gabriela Schiechl* für die umfassende gewissenhafte Korrektur meiner Dissertation, die intensive Unterstützung in der Endphase, die aufmunternden Worte, die fachlichen und die nicht-fachlichen Gespräche, aus denen ich immer wieder neue Kraft und Motivation geschöpft habe.

Ganz besonders möchte ich *Andreas Steege* danken. Mit seiner Hilfe waren die vielen kleinen und großen Hindernisse auf dem Weg zur Promotion so viel leichter zu bewältigen. Danke für die fachliche Unterstützung, die Gedankenexperimente, die unendliche Geduld und die vielen aufbauenden Worte.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die mir meinen Traum vom Tierarztberuf und die Anfertigung dieser Doktorarbeit ermöglichte, mich darin weiterhin unterstützt und bestärkt und in allen Lebenslagen immer voll und ganz hinter mir steht und für mich da ist.

Ein besonderes Dankeschön geht an meinen Lebenspartner *Patrick Poth*, den weder das Chaos aus Büchern, Laptop, Papern und Teetassen noch meine wechselnden Gefühlszustände während des Erstellens dieser Arbeit gestört haben und der mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückholt.

Zu guter Letzt möchte ich, wenn es vielleicht auch nicht in eine wissenschaftliche Arbeit gehört, meiner Stute *Momo* danken. Sie hat es immer geschafft aus Unmut, Verzweiflung und trüben Gedanken gute Laune, Motivation, Antrieb und Sonnenschein zu machen und damit wesentlich zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen.